This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images, please do not report the images to the Image Problem Mailbox.

PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM, Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7 : C12N 15/53, 15/54, 15/82, 9/10, 9/04, C12Q 1/02, A01H 5/00

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 00/08169**

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 17. Februar 2000 (17.02.00)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/05467

(22) Internationales Anmeldedatum: 30. Juli 1999 (30.07.99)

(30) Prioritätsdaten:

198 35 219.0	5. August 1998 (05.08.98)	DE
198 45 216.0	1. Oktober 1998 (01.10.98)	DE
198 45 231.4	1. Oktober 1998 (01.10.98)	DE
198 45 224.1	1. Oktober 1998 (01.10.98)	DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: SUNGENE GMBH & CO.KGAA [DE/DE]; Corrensstrasse 3, D-06468 Gatersleben (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: REINDL, Andreas [DE/DE]; Albertine-Scherer-Strasse 21, D-67134 Birkenheide (DE). MEJIA, Patricia Leon [MX/MX]; Ganzalo de Sandoval 226, Cuernavaca, Morelos 62250 (MX). PALMAS, Juan Manuel Esteves [MX/MX]; Entrada a Ojo de Agua Col., Loma Bonita Tecamac Estado (MX). GRACIA, Maria Araceli Canter [MX/MX]; 2da Privad Los Pinos 22, Loma Bonita Cuernavaca, Morelos 62210 (MX). EBNETH, Marcus [DE/DE]; Bicklingerweg 16, D-06486 Quedlinburg (DE). HERBERS, Karin [DE/DE]; Am Hange 6, D-06484 Quedlinburg (DE).

(74) Anwalt: LANGFINGER, Klaus-Dieter; BASF Aktiengesellschaft, D-67056 Ludwigshafen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AU, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, GE, HR, HU, ID, IL, IN, JP, KR, KZ, LT, LV, MK, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TR, UA, US, ZA, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

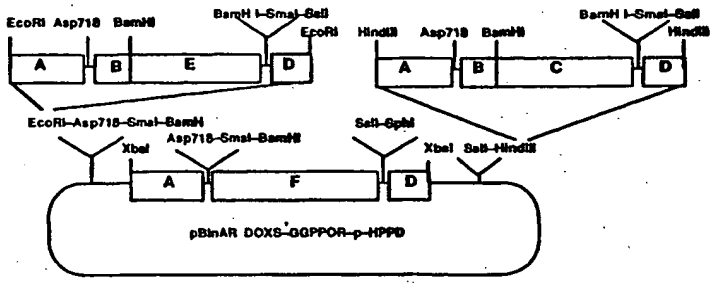
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: DNA SEQUENCE CODING FOR A 1-DEOXY-D-XYLULOSE-5-PHOSPHATE SYNTHASE AND THE OVERPRODUCTION THEREOF IN PLANTS

(54) Bezeichnung: DNA-SEQUENZ KODIEREND FÜR EINE 1-DEOXY-D-XYLULOSE-5-PHOSPHAT SYNTHASE UND DEREN ÜBERPRODUKTION IN PFLANZEN

Binärer Vektor zur Überexpression des DOXS-Gens aus *E. coli*, des GGPPOR-Gens aus *Arabidopsis thaliana* und des HPPD-Gens aus *Streptomyces avermitilis* in den Plastiden transgener Pflanzen.

BINARY VECTOR FOR OVEREXPRESSING THE DOXS-GENE FROM E. COLI, THE GGPPOR GENE FROM ARABIDOPSIS THALIANA AND THE HPPD GENE FROM STREPTOMYCES AVERMITILIS IN THE PLASTIDS OF TRANSGENIC PLANTS



(57) Abstract

Method for the production of plants with enhanced vitamin E biosynthesis efficiency by overproduction of a 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase gene from Arabidopsis or E. coli.

(57) Zusammenfassung

Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Vitamin E Biosyntheseleistung durch Überexpression eines pflanzlichen 1–Deoxy–D–Xylulose–5–Phosphat Synthase–Gens aus Arabidopsis bzw. E. coli.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

BNSDOCID: <WO___0008169A1_I_>

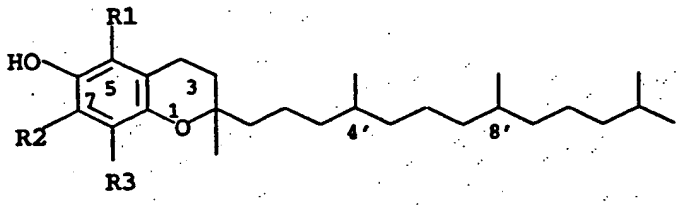
DNA-Sequenz kodierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase und deren Überproduktion in Pflanzen

Beschreibung

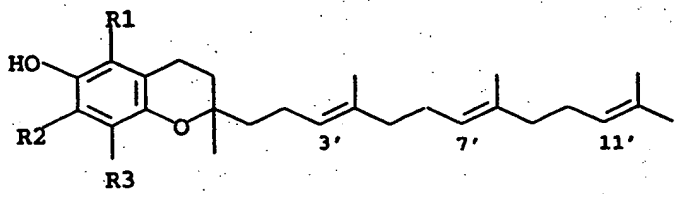
Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, speziell die Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 oder einer mit dieser hybridisierenden DNA-Sequenz, die Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen kodierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) und eine p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und/oder Carotinoiden, die Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und einer DNA-Sequenz SEQ ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen kodierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) und eine Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und/oder Carotinoiden, die Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3, einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 5 und einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen kodierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS), eine Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD) und eine Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und/oder Carotinoiden, Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3; SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5; SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 7 bzw. eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5 und SEQ-ID No. 7, die derart hergestellten Pflanzen selbst, sowie die Verwendung der SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der DOXS.

Ein wichtiges Ziel pflanzenmolekulargenetischer Arbeiten ist bisher die Erzeugung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Zuckern, Enzymen und Aminosäuren. Wirtschaftlich interessant ist jedoch auch die Entwicklung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Vitaminen, wie z.B. der Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes.

Die in der Natur vorkommenden acht Verbindungen mit Vitamin E-Aktivität sind Derivate des 6-Chromanols (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A 27 (1996), VCH Verlagsgesellschaft, Chapter 4., 478-488, Vitamin E). Die erste Gruppe (1a-d) stammt von Tocopherol ab, die zweite Gruppe besteht aus Derivaten des Tocotrienols (2a- d):



1a, α-Tocopherol: $R^1 = R^2 = R^3 = CH_3$
1b, β-Tocopherol [148-03-8]: $R^1 = R^3 = CH_3$, $R^2 = H$
1c, γ-Tocopherol [54-28-4]: $R^1 = H$, $R^2 = R^3 = CH_3$
1d, δ-Tocopherol [119-13-1]: $R^1 = R^2 = H$, $R^3 = CH_3$



2a, α-Tocotrienol [1721-51-3]: $R^1 = R^2 = R^3 = CH_3$
2b, β-Tocotrienol [490-23-3]: $R^1 = R^3 = CH_3$, $R^2 = H$
2c, γ-Tocotrienol [14101-61-2]: $R^1 = H$, $R^2 = R^3 = CH_3$
2d, δ-Tocotrienol [25612-59-3]: $R^1 = R^2 = H$, $R^3 = CH_3$

Wirtschaftlich große Bedeutung besitzt α-Tocopherol.

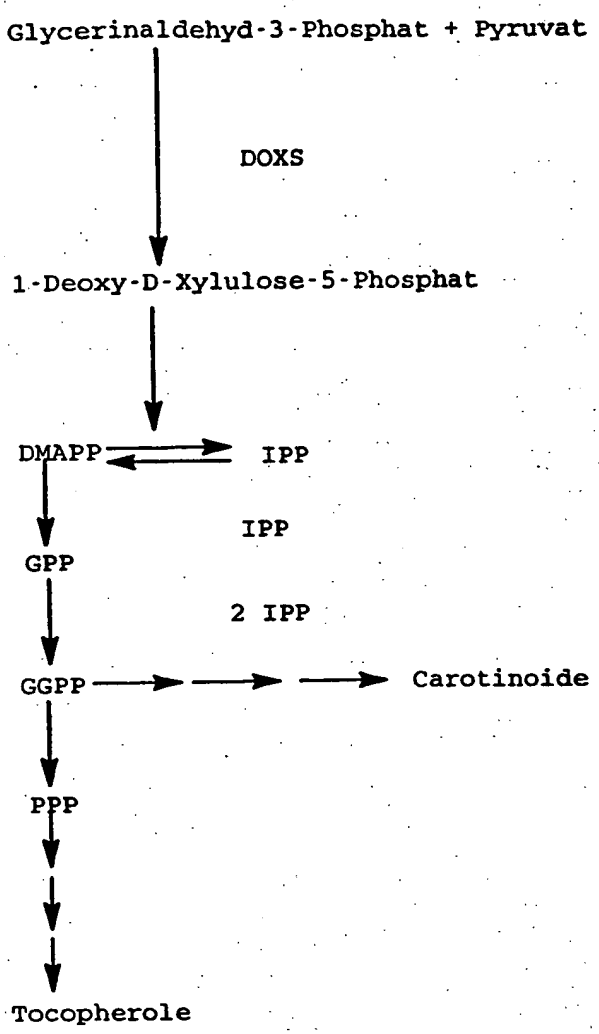
Der Entwicklung von Kulturpflanzen mit erhöhtem Tocopherol-Gehalt durch Gewebekultur oder Samenmutagenese und natürliche Auswahl sind Grenzen gesetzt. So muß einerseits der Tocopherol-Gehalt bereits in Gewebekultur erfaßbar sein und andererseits können nur diejenigen Pflanzen über Gewebekulturtechniken manipuliert werden, deren Regeneration zu ganzen Pflanzen aus Zellkulturen gelingt. Außerdem können Kulturpflanzen nach Mutagenese und Selektion unerwünschte Eigenschaften zeigen, die durch teilweise mehrmalige Rückkreuzungen wieder beseitigt werden müssen. Auch wäre die Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes durch Kreuzung auf Pflanzen der selben Art beschränkt.

BNSDOCID: <WO___0008169A1_I_>

Aus diesen Gründen ist das gentechnische Vorgehen, ein für die Tocopherol Syntheseleistung kodierendes, essentielles Biosynthesegen zu isolieren und in Kulturpflanzen gezielt zu übertragen, dem klassischen Züchtungsverfahren überlegen. Dieses Verfahren setzt voraus, daß die Biosynthese und deren Regulation bekannt ist und daß Gene, die die Biosyntheseleistung beeinflussen, identifiziert werden.

Isoprenoide oder Terpenoide bestehen aus verschiedenen Klassen lipidlöslicher Moleküle und werden teilweise oder vollständig aus C_5-Isopren-Einheiten gebildet. Reine Prenyllipide (z.B. Carotinoide) bestehen aus C-Skeletten, die ausschließlich auf Isopren-Einheiten zurückgehen, während gemischte Prenyllipide (z.B. Chlorophyll) eine Isoprenoid-Seitenkette besitzen, die mit einem aromatischen Kern verbunden ist.

Ausgangspunkt der Biosynthese von Prenyllipiden sind 3 x Acetyl-CoA Einheiten, die über ß-Hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) und Mevalonat in die Ausgangs-Isopren-Einheit (C_5), dem Isopentenylpyrophosphat (IPP), umgewandelt werden. Kürzlich wurde durch in vivo Fütterungsexperimente mit C^{13} gezeigt, daß in verschiedenen Eubakterien, Grünalgen und pflanzlichen Chloroplasten ein Mevalonat-unabhängiger Weg zur Bildung von IPP beschritten wird:



Dabei werden Hydroxyethylthiamin, das durch Decarboxylierung von Pyruvat entsteht, und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (3-GAP) in einer durch die 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase vermittelten "Transketolase"-Reaktion zunächst in 1-Deoxy-D-Xylulose-5-phosphat umgewandelt (Schwender et al., FEBS Lett. 414(1),129-134(1997); Arigoni et al., Proc.Natl.Acad.Sci USA 94(2), 10600-10605 (1997); Lange et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95(5), 2100-2104(1998); Lichtenthaler et al., FEBS Lett. 400(3), 271-274(1997). Dieses wird dann durch eine intramolekulare Umordnung in IPP umgesetzt (Arigoni et al., 1997). Biochemische Daten deuten darauf hin, daß der Mevalonat-Weg im Zytosol operiert und zur Bildung von Phytosterolen führt. Das Antibiotikum Mevinolin, ein spezifischer Inhibitor der Mevalonat-Bildung, führt lediglich zur Inhibition der Sterol-Biosynthese im Zytoplasma, während die Prenyllipid-Bildung in den Plastiden unbeeinflußt ist (Bach und Lichtenthaler, Physiol. Plant 59(1983), 50-60. Der Mevalonat-

BNSDOCID: <WO __0008169A1_I_>

unabhängige Weg ist dagegen plastidär lokalisiert und führt vornehmlich zur Bildung von Carotinoiden und plastidären Prenyllipiden (Schwender et al., 1997; Arigoni et al, 1997).

IPP steht im Gleichgewicht mit seinem Isomer, dem Dimethylallyl Pyrophosphat (DMAPP). Eine Kondensation von IPP mit DMAPP in Kopf-Schwanz Anlagerung ergibt das Monoterpen (C_{10}) Geranyl-Pyrophosphat (GPP). Die Addition von weiteren IPP Einheiten führt zum Sesquiterpen (C_{15}) Farnesy-Pyrophosphat (FPP) und zum Diterpen (C_{20}) Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat (GGPP). Die Verknüpfung zweier GGPP Moleküle führt zur Bildung der C_{40}-Vorläufer für Carotinoide. GGPP wird durch eine Prenylketten-Hydrogenase zum Phytyl-Pyrophosphat (PPP) umgeformt, dem Ausgangsstoff für die weitere Bildung von Tocopherolen.

Bei den Ringstrukturen der gemischten Prenyllipide, die zur Bildung der Vitamine E und K führen, handelt es sich um Quinone, deren Ausgangsmetabolite aus dem Shikimat-Weg stammen. Die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin bzw. Tyrosin werden in Hydroxyphenyl-Pyruvat umgewandelt, welches durch Dioxygenierung in Homogentisinsäure überführt wird. Diese wird an PPP gebunden, um den Vorläufer von α-Tocopherol und α-Tocoquinon, das 2-Methyl-6-phytylquinol, zu bilden. Durch Methylierungsschritte mit S-Adenosylmethionin als Methyl-Gruppen-Donor entsteht zunächst 2,3-Dimethyl-6-phytylquinol, dann durch Zyklisierung γ-Tocopherol und durch nochmalige Methylierung α-Tocopherol (Richter, Biochemie der Pflanzen, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1996).

In der Literatur finden sich Beispiele die zeigen, daß die Manipulation eines Enzyms den Metabolit-Fluß direktional beeinflußen kann. In Experimenten mit einer veränderten Expression der Phytoen Synthase, welche zwei GGPP-Moleküle zu 15-cis-Phytoen miteinander verknüpft, konnte ein direkter Einfluß auf die Carotinoid-Mengen dieser transgenen Tomatenpflanzen gemessen werden (Fray und Grierson, Plant Mol.Biol.22(4),589-602(1993); Fray et al., Plant J., 8, 693-701(1995). Wie zu erwarten, zeigen transgene Tabakpflanzen mit verringerten Mengen an Phenylalanin-Ammonium Lyase reduzierte Phenylpropanoid-Mengen. Das Enzym Phenylalanin-Ammonium Lyase katalysiert den Abbau von Phenylalanin, entzieht es also der Phenylpropanoid-Biosynthese (Bate et al.,Proc. Natl. Acad. Sci USA 91 (16): 7608-7612 (1994); Howles et al., Plant Physiol. 112. 1617-1624(1996).

Über die Erhöhung des Metabolitflusses zur Steigerung des Tocopherol-Gehaltes in Pflanzen durch Übeexpression einzelner Biosynthesegene ist bisher wenig bekannt. Lediglich WO 97/27285 beschreibt eine Modifikation des Tocopherol-Gehaltes durch

verstärkte Expression bzw. durch Herunterregulation des Enzyms p-Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase (HPPD).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Entwicklung einer transgenen Pflanze mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und Carotinoiden.

Die Aufgabe wurden überraschenderweise gelöst durch die Überexpression eines 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Sythase (DOXS)-Gens in den Pflanzen.

Um den Metabolit-Fluß aus dem Primärstoffwechsel in den Isoprenoid-Stoffwechsel zu verstärken, wurde die Bildung von IPP als allgemeines Ausgangssubstrat für alle plastidären Isoprenoide erhöht. Zu diesem Zweck wurde in Pflanzen die Aktivität der DOXS durch Überexpression des homologen Gens (Gen aus Orgnismus der selben Art) erhöht. Dies kann auch durch die Expression eines heterologen Gens (Gens aus entfernten Organismen) erreicht werden. Nukleotidsequenzen sind aus Arabidopsis thaliana DOXS (Acc. No. U 27099), Reis (Acc. No. AF024512) und Pfefferminze (Acc. No. AF019383) beschrieben.

In einem Ausführungsbeispiel 1 wird das DOXS-Gen aus Arabidopsis thaliana (SEQ-ID No.:1; Mandel et al, Plant J. 9, 649-658(1996); Acc. No. U27099) in transgenen Pflanzen verstärkt exprimiert. Eine Plastidenlokalisierung ist durch die in der Gensequenz enthaltenen Transitsignalsequenz gewährleistet. Auch geeignet als Expressionskassette ist eine DNA-Sequenz, die für ein DOXS-Gen kodiert, das mit SEQ-ID No. 1 hybridisiert und das aus anderen Organismen wie zum Beispiel E. coli (SEQ-ID No. 3) bzw. vorzugsweise aus anderen Pflanzen stammt.

Das nun vermehrt zur Verfügung stehende GGPP wird weiter in Richtung Tocopherole und Carotinoide umgesetzt.

Die effiziente Bildung von Carotinoiden ist essentiell für die Photosynthese, wobei sie neben den Chlorophyllen als "Lichtsammler-Komplexe" zur besseren Ausnutzung der Photonenenergie dienen (Heldt, Pflanzenbiochemie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin Oxford, 1996). Zusätzlich erfüllen Carotinoide wichtige Schutzfunktionen gegen Sauerstoff-Radikale wie den Singulett-Sauerstoff, den sie wieder in den Grundzustand zurückführen können (Asada, 1994; Demming-Adams und Adams, Trends in Plant Sciences 1; 21-26(1996). Es wurde eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase defekte Arabidopsis thaliana Mutante isoliert, die einen "Albino-Phänotyp" zeigt (Mandel et al, 1996).

Daraus ist abzuleiten, daß eine verringerte Menge an Carotinoiden in den Plastiden negative Auswirkungen auf die Pflanze hat.

Die Aufgabe wurden auch gelöst durch die Überexpression eines 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS)-Gens und eines p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD)-Gens in den Pflanzen, siehe Abbildung 1.

Um den Metabolit-Fluß aus dem Primärstoffwechsel in den Isoprenoid-Stoffwechsel zu verstärken, wurde die Bildung von IPP als allgemeines Ausgangssubstrat für alle plastidären Isoprenoide erhöht. Zu diesem Zweck wurde in transgenen Tabak- und Rapspflanzen die Aktivität der DOXS durch Überexpression der DOXS aus E.coli erhöht. Dies kann durch Expression homologer oder anderer heterologer Gene erreicht werden.

Das nun vermehrt zur Verfügung stehende D-1-Desoxy-Xylulose-5-Phosphat wird weiter in Richtung Tocopherole und Carotinoide umgesetzt.

Darüberhinaus verstärkt die Bildung von Homogentisinsäure den Metabolitfluß weiter in Richtung von Phytylquinonen und damit Tocopherol, siehe Abbildung 1. Homogentisinsäure wird gebildet aus p-Hydroxyphenylpyruvat durch das Enzym p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD). cDNAs, die für dieses Enzym kodieren, wurden aus verschiedenen Organismen wie beispielsweise aus Mikroorganismen, aus Pflanzen und aus dem Menschen beschrieben.

In Ausführungsbeispiel 11 wurde erstmals das HPPD-Gen aus Streptomyces avermitilis (Denoya et al., J. Bacteriol. 176(1994), 5312-5319; SEQ-ID No. 5) zusammen mit der DOXS aus E.coli SEQ-ID No. 3 in Pflanzen und pflanzlichen Plastiden überexprimiert.

Die Erhöhung der plastidären IPP Bildung führt zur verstärkten Bildung aller plastidären Isoprenoide. Die erhöhte Bereitstellung von Homogentisinsäure gewährleistet, daß genügend Substrat für die Bildung von Tocopherolen in den Plastiden zur Verfügung steht. Dieses nun vermehrt zur Verfügung stehende Homogentisat kann in den transgenen Pflanzen seinerseits mit der durch die Überexpression der DOXS erhöhten Menge an Phytyldiphosphat (PPP) umgesetzt werden. PPP nimmt dabei eine Schlüsselstellung ein, da es einerseits als Ausgangssubstrat für Chlorophylle und Phylloquinone, andererseits für Tocopherole dient.

Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgt durch Transformation der Pflanzen mit einem das DOXS-und das HPPD-Gen enthaltenden Konstrukt. Als Modellpflanzen für die Produktion von

Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und Carotinoiden wurden Tabak und Raps eingesetzt.

Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung der DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5, die für eine DOXS bzw. HPPD oder deren funktionelle Äquivalente kodieren, zur Herstellung einer Pflanze mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt. Die Nukleinsäuresequenzen können dabei z.B. DNA- oder cDNA-Sequenzen sein. Zur Insertion in eine Expressionskassette geeignete kodierende Sequenzen sind beispielsweise solche, die für eine DOXS bzw. HPPD kodieren und die dem Wirt die Fähigkeit zur Überproduktion von Tocopherol verleihen.

Die Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für das DOXS- bzw. HPPD-Gen operativ verknüpft sind.

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten DOXS- bzw. HPPD-DNA Sequenz und vorzugsweise einer zwischen Promotor und DOXS- bzw. HPPD DNA-Sequenz inserierten DNA, die für ein chloroplastenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren DNA-Sequenz für ein DOXS- bzw. HPPD-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chloroplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation des DOXS- bzw. HPPD-Gens in die Chloroplasten vom DOXS- bzw. HPPD-Teil enzymatisch abgespalten werden. Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären Transketolase (TK)

oder einem funktionellen Äquivalent dieses Transitpeptids (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase) abgeleitet ist.

Vorzugsweise wird die fusionierte Expressionskassette, die für ein DOXS-Gen und ein HPPD-Gen kodiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19, kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer Expressionskassette enthaltend DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Transformation von Pflanzen, -zellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Erhöhung des Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und Carotinoid-Gehaltes der Pflanze.

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, transformiert mit einer Expressionskassette enthaltend die Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Gerste, Weizen, Roggen, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

- Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man Expressionskassetten enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzen einbringt.

- Verwendung der DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vita-

BNSDOCID: <WO__0008169A1_I_>

min K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt durch Expression einer DOXS und einer HPPD DNA-Sequenz in Pflanzen.

Die Aufgabe wurden auch gelöst durch die Überexpression eines 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS)-Gens und eines Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR)-Gens in den Pflanzen, siehe Abbildung 1.

Um den Metabolit-Fluß aus dem Primärstoffwechsel in den Isoprenoid-Stoffwechsel zu verstärken, wurde die Bildung von IPP als allgemeines Ausgangssubstrat für alle plastidären Isoprenoide erhöht. Zu diesem Zweck wurde in transgenen Tabak- und Rapspflanzen die Aktivität der DOXS durch Überexpression der DOXS aus E.coli erhöht. Dies kann durch Expression homologer oder anderer heterologer Gene erreicht werden.

Um das nun vermehrt zur Verfügung stehende GGPP in Richtung Tocopherole und Carotinoide umzusetzen, wird in einem weiteren erfindungswesentlichen Schritt zusätzlich die Aktivität des Enzyms Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase durch Überexpression eines entsprechenden Gens gesteigert. Durch diese Maßnahme wird eine verstärkte Bildung von Phytylpyrophosphat durch verstärkte Umsetzung von Geranylgeranyl-Pyrophosphat zu Phytylpyrophosphat erreicht.

Hierzu wird beispielsweise das GGPPOR-Gen aus Arabidopsis thaliana (SEQ-ID No. 7) in transgenenen Pflanzen verstärkt exprimiert. Um eine Plastidenlokalisation zu gewährleisten ist der Arabidopsis GGPPOR eine Transitsignalsequenz vorangestellt. Auch geeignet als Expressionskassette ist eine DNA-Sequenz, die für ein GGPPOR-Gen codiert, das mit SEQ-ID No. 7 hybridisiert und das aus anderen Organismen bzw. aus anderen Pflanzen stammt.

In Ausführungsbeispiel 15 ist die Klonierung des GGPPOR-Gens aus Arabidopsis thaliana beschrieben.

Die Erhöhung der plastidären 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat und Phytylpyrophosphat Bildung führt zur verstärkten Bildung aller plastidären Isoprenoide, so daß genügend Substrat für die Bildung von Tocopherolen, Chlorophyllen, Vitamin K und Phylloquinonen in den Plastiden zur Verfügung steht.

Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgt durch Transformation der Pflanzen mit einem das DOXS-und das GGPPOR-Gen enthaltenden Konstrukt. Als Modellpflanzen für die Produktion von

Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und Carotinoiden wurden Tabak und Raps eingesetzt.

Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 7 die für eine DOXS bzw. GGPPOR oder deren funktionelle Äquivalente kodieren, zur Herstellung einer Pflanze mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt. Die Nukleinsäuresequenzen können dabei z.B. DNA- oder cDNA-Sequenzen sein. Zur Insertion in eine Expressionskassette geeignete kodierende Sequenzen sind beispielsweise solche, die für eine DOXS bzw. GGPPOR kodieren und die dem Wirt die Fähigkeit zur Überproduktion von Tocopherol verleihen.

Die Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für das DOXS- bzw. GGPPOR-Gen operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Tabak-Transformationsvektor pBinAR-Hyg eingebaut werden. Abb. 2 zeigt die Tabaktransformationsvektoren pBinAR-Hyg mit 35S-Promotor (A) bzw. pBinAR-Hyg mit samenspezifischem Promotor Phaseolin 796 (B):

- HPT: Hygromycin-Phosphotransferase
- OCS: Octopin-Synthase-Terminator
- PNOS: Nopalin-Synthase-Promotor
- außerdem sind solche Restriktionsschnittstellen eingezeichnet, die nur einmal den Vektor schneiden.

BNSDOCID: <WO___0008169A1_L>

Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285 - 294). Dieser Promotor enthält bekanntlich unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 2195-2202).

Die Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen DOXS- bzw. GGPPOR-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren wie z.B. der PRP1-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzenesulfonamid-induzierbarer (EP-A 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397-404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor können u.a. verwendet werden.

Weiterhin sind insbesonders solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen die Biosynthese von Tocopherol bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445 - 245).

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten DOXS- bzw. GGPPOR-DNA Sequenz und vorzugsweise einer zwischen Promotor und DOXS- bzw. GGPPOR-DNA-Sequenz inserierten DNA, die für ein chloroplastenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren DNA-Sequenz für ein DOXS- bzw. GGPPOR-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chloroplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation des DOXS- bzw. GGPPOR-Gens in die Chloroplasten vom DOXS- bzw. GGPPOR-Teil enzymatisch abgespalten werden. Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären Transketolase (TK) oder einem funktionellen Äquivalent dieses Transitpeptids (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase) abgeleitet ist.

Vorzugsweise wird die fusionierte Expressionskassette, die für ein DOXS-Gen bzw. ein GGPPOR-Gen kodiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19, kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer Expressionskassette enthaltend DNA-Sequenzen SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 3, SEQ-ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Transformation von Pflanzen, -zellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Erhöhung des Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und Carotinoid-Gehaltes der Pflanze.

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, transformiert mit einer Expressionskassette enthaltend die Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Gerste, Weizen, Roggen, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

- Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man Expressionskassetten enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 3 und eine SEQ-ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequen-

BNSDOCID: <WO__0008169A1_I_>

zen in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzen einbringt.

- Verwendung der DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt durch Expression einer DOXS und einer GGPPOR DNA-Sequenz in Pflanzen.

Die Aufgabe wurden auch gelöst durch die Überexpression eines 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS)-Gens, eines p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD)-Gens und eines Geranylgeranylpyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR)-Gens in den Pflanzen, siehe Abbildung 1.

Um den Metabolit-Fluß aus dem Primärstoffwechsel in den Isoprenoid-Stoffwechsel zu verstärken, wurde die Bildung von IPP als allgemeines Ausgangssubstrat für alle plastidären Isoprenoide erhöht. Zu diesem Zweck wurde in transgenen Tabak- und Rapspflanzen die Aktivität der DOXS durch Überexpression der DOXS aus E.coli erhöht. Dies kann auch durch Expression homologer oder anderer heterologer DOXS-Gene - wie zum Beispiel einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 - erreicht werden.

Das nun vermehrt zur Verfügung stehende D-1-Desoxy-Xylulose-5-Phosphat wird weiter in Richtung Geranylgeranylpyrophosphat umgesetzt.

Um das vermehrt zur Verfügung stehende GGPP in Richtung Tocopherole und Carotinoide umzusetzen, wird in einem weiteren erfindungswesentlichen Schritt zusätzlich die Aktivität des Enzyms Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase durch Überexpression eines entsprechenden homologen oder heterologen Gens gesteigert. Durch diese Maßnahme wird eine verstärkte Bildung von Phytylpyrophosphat durch verstärkte Umsetzung von Geranylgeranyl-Pyrophosphat zu Phytylpyrophosphat erreicht.

Hierzu wird beispielsweise das GGPPOR-Gen aus Arabidopsis thaliana (SEQ-ID No. 7) in transgenen Pflanzen verstärkt exprimiert. Um eine Plastidenlokalisation zu gewährleisten ist der Arabidopsis GGPPOR eine Transitsignalsequenz vorangestellt. Auch geeignet als Expressionskassette ist eine DNA-Sequenz, die für ein GGPPOR-Gen codiert, das mit SEQ-ID No. 7 hybridisiert und das aus anderen Organismen bzw. aus anderen Pflanzen stammt.

BNSDOCID: <WO___0008169A1_I_>

In Ausführungsbeispiel 15 ist die Klonierung des GGPPOR-Gens aus Arabidopsis thaliana beschrieben.

Um das vermehrt zur Verfügung stehende PPP in Richtung Tocopherole und Carotinoide umzusetzen, wird in einem weiteren erfindungswesentlichen Schritt zusätzlich die Aktivität des Enzyms p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD) durch Überexpression eines entsprechenden homologen oder heterologen Gens gesteigert. Durch diese Maßnahme wird eine verstärkte Bildung von Homogentisinsäure durch verstärkte Umsetzung von Hydroxyphenylpyruvat in Homogentisinsäure erreicht.

cDNAs, die für dieses Enzym kodieren, wurden aus verschiedenen Organismen wie beispielsweise aus Mikroorganismen, aus Pflanzen und aus dem Menschen beschrieben.

In Ausführungsbeispiel 10 wird die Klonierung des HPPD-Gens aus Streptomyces avermitilis beschrieben (Denoya et al., J. Bacteriol. 176(1994), 5312-5319; SEQ-ID No. 5). Um eine Plastidenlokalisation zu gewährleisten ist der HPPD aus Streptomyces eine Transitsignalsequenz vorangestellt. Auch geeignet als Expressionskassette ist eine DNA-Sequenz, die für ein HPPD-Gen codiert, das mit SEQ-ID No. 5 hybridisiert und das aus anderen Organismen bzw. aus Pflanzen stammt.

Die Erhöhung der plastidären D-1-Desoxy-Xylulose-5-Phosphat, der Phytylpyrophosphat und der Homogentisinsäure Bildung führt zur verstärkten Bildung aller plastidären Isoprenoide. Die erhöhte Bereitstellung dieser Vorstufen gewährleistet, daß genügend Substrat für die Bildung von Tocopherolen, Chlorophylle, Vitamin K und Phylloquinone in den Plastiden zur Verfügung steht.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen erfolgt durch Transformation der Pflanzen mit einem das DOXS-, das HPPD-Gen und das GGPPOR-Gen enthaltenden Konstrukt (Beispiel 17). Als Modellpflanzen für die Produktion von Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und Carotinoiden wurden Tabak und Raps eingesetzt.

Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3, SEQ-ID No. 5 und SEQ-ID No. 7, die für eine DOXS, eine HPPD und eine GGPPOR oder deren funktionelle Äquivalente kodieren, zur Herstellung einer Pflanze mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt. Die Nukleinsäuresequenzen können dabei z.B. DNA- oder cDNA-Sequenzen sein. Zur Insertion in eine Expressionskassette geeignete kodierende Sequenzen sind beispielsweise solche, die

für eine DOXS, eine HPPD und eine GGPPOR kodieren und die dem Wirt die Fähigkeit zur Überproduktion von Tocopherol verleihen.

Die Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für das DOXS-, das HPPD- bzw. das GGPPOR-Gen operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Tabak-Transformationsvektor pBinAR-Hyg eingebaut werden. Abb. 2 zeigt die Tabaktransformationsvektoren pBinAR-Hyg mit 35S-Promotor (A) bzw. pBinAR-Hyg mit samenspezifischem Promotor Phaseolin 796 (B):

- HPT: Hygromycin-Phosphotransferase
- OCS: Octopin-Synthase-Terminator
- PNOS: Nopalin-Synthase-Promotor
- außerdem sind solche Restriktionsschnittstellen eingezeichnet, die nur einmal den Vektor schneiden.

Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285 - 294). Dieser Promotor enthält bekanntlich unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des

eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 2195-2202).

Die Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen DOXS-, HPPD-, bzw. GGPPOR-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren wie z.B. der PRP1-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzenesulfonamid-induzierbarer (EP-A 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397-404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor können u.a. verwendet werden.

Weiterhin sind insbesonders solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen die Biosynthese von Tocopherol bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445 - 245).

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten DOXS-, HPPD- bzw. GGPPOR-DNA Sequenz und vorzugsweise einer zwischen Promotor und DOXS-,HPPD- bzw. GGPPOR-DNA-Sequenz inserierten DNA, die für ein chloroplastenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren DNA-Sequenz für ein DOXS-, HPPD- bzw. GGPPOR-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chloroplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation des DOXS-, HPPD- bzw. GGPPOR-Gens in die Chloroplasten vom DOXS-, HPPD- bzw. GGPPOR-Teil enzymatisch abgespalten werden. Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären Transketolase (TK) oder einem funktionellen Äquivalent die-

ses Transitpeptids (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase) abgeleitet ist.

Vorzugsweise wird die fusionierte Expressionskassette, die für ein DOXS-Gen, ein HPPD-Gen und ein GGPPOR-Gen kodiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19, kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer Expressionskassette enthaltend DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3, SEQ-ID No. 5 und SEQ-ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Transformation von Pflanzen, -zellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Erhöhung des Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und Carotinoid-Gehaltes der Pflanze.

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, transformiert mit einer Expressionskassette enthaltend die Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3, SEQ-ID No. 5 und SEQ-ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Gerste, Weizen, Roggen, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

- Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man Expressionskassetten enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3, eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 5 und eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzen einbringt.

- Verwendung der DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3, SEQ-ID No. 5 und SEQ-ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Toco-

pherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt durch Expression einer DOXS-, einer HPPD- und einer GGPPOR-DNA-Sequenz in Pflanzen.

Zusätzliche Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher die Entwicklung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der DOXS.

Diese Aufgabe wurde gelöst durch die Expression eines DOXS-Gens aus Arabidopsis oder E. coli bzw. damit hybridisierende DNA-Sequenzen und anschließende Testung von Chemikalien auf Hemmung der DOXS-Enzymaktivität.

Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgt durch Transformation der Pflanzen mit einem das DOXS-Gen enthaltenden Konstrukt. Als Modellpflanzen für die Produktion von Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und Carotinoiden wurden Arabidopsis und Raps eingesetzt.

Die Klonierung des vollständigen DOXS-Gens aus Arabidopsis erfolgt über die Isolierung der für das DOXS-Gen spezifischen cDNA (SEQ-ID No. 1).

Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 die für eine DOXS oder deren funktionelles Äquivalent kodiert, zur Herstellung einer Pflanze mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt. Die Nukleinsäuresequenz kann dabei z.B. eine DNA- oder eine cDNA-Sequenz sein. Zur Insertion in eine Expressionskassette geeignete kodierende Sequenzen sind beispielsweise solche, die für eine DOXS kodieren und die dem Wirt die Fähigkeit zur Überproduktion von Tocopherol verleihen.

Die Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für das DOXS-Gen operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen

BNSDOCID: <WO___0008169A1_I_>

sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaic-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987) 8693 -8711).

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Tabak-Transformationsvektor pBinAR-Hyg eingebaut werden. Abb. zeigt die Tabaktransformationsvektoren pBinAR-Hyg mit 35S-Promotor (A) bzw. pBinAR-Hyg mit samenspezifischem Promotor Phaseolin 796 (B):

- HPT: Hygromycin-Phosphotransferase
- OCS: Octopin-Synthase-Terminator
- PNOS: Nopalin-Synthase-Promotor
- außerdem sind solche Restriktionsschnittstellen eingezeichnet, die nur einmal den Vektor schneiden.

Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285 - 294). Dieser Promotor enthält bekanntlich unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 2195 - 2202).

Die Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen DOXS-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren wie z.B. der PRP1-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzenesulfonamid-induzierbarer (EP-A 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397-404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor können u.a. verwendet werden.

Weiterhin sind insbesonders solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen die Biosynthese von Tocopherol bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische

Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989) 2445 - 245).

Mit Hilfe eines samenspezifischen Promotors konnte ein Fremdprotein stabil bis zu einem Anteil von 0,67 % des gesamten löslichen Samenproteins in den Samen transgener Tabakpflanzen exprimiert werden (Fiedler und Conrad, Bio/Technology 10 (1995), 1090-1094). Die Expressionskassette kann daher beispielsweise einen samenspezifischen Promotor (bevorzugt den Phaseolin-Promotor (US 5504200), den USP- (Baumlein, H. et al. Mol. Gen. Genet. (1991) 225 (3), 459 - 467) oder LEB4-Promotor (Fiedler und Conrad, 1995)), das LEB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und ein ER-Retentionssignal enthalten. Der Aufbau einer derartigen Kassette ist in der Abbildung 2 schematisch beispielhaft dargestellt.

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten DOXS-DNA Sequenz und vorzugsweise einer zwischen Promotor und DOXS-DNA-Sequenz inserierten DNA, die für ein chloroplastenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

Insbesondere bevorzugt sind Sequenzen, die ein Targeting in den Apoplasten, in Plastiden, in die Vakuole, in das Mitochondrium, in das Endoplasmatische Retikulum (ER) oder durch ein Fehlen entsprechender operativer Sequenzen einen Verbleib im Kompartiment des Entstehens, dem Zytosol, gewährleisten (Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996), 285 - 423). Für die Menge der Proteinakkumulation in transgenen Pflanzen besonders förderlich erwiesen hat sich eine Lokalisation im ER (Schouten et al., Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781 - 792).

Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren DNA-Sequenz für ein DOXS-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Besonders bevorzugt sind für die Chloroplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation des DOXS-Gens in die Chloroplasten vom DOXS-Teil enzymatisch abge-

spalten werden. Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären Transketolase (TK) oder einem funktionellen Äquivalent dieses Transitpeptids (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase) abgeleitet ist.

Die inserierte Nukleotid-Sequenz kodierend für eine DOXS kann synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen DOXS-Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen. Im allgemeinen werden synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons erzeugt, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden. Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine DNA-Sequenz die für ein DOXS-Gen codiert und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primerrepair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffül-

len von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

Von Bedeutung für den erfindungsgemäßen Erfolg kann u.a. das Anhängen des spezifischen ER-Retentionssignals SEKDEL sein (Schouten, A. et al. Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781 - 792), die durchschnittliche Expressionshöhe wird damit verdreifacht bis vervierfacht. Es können auch andere Retentionssignale, die natürlicherweise bei im ER lokalisierten pflanzlichen und tierischen Proteinen vorkommen, für den Aufbau der Kassette eingesetzt werden.

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

Eine Expressionskassette kann beispielsweise einen konstitutiven Promotor (bevorzugt den CaMV 35 S-Promotor), das LeB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und das ER-Retentionssignal enthalten. Als ER-Retentionssignal wird bevorzugt die Aminosäuresequenz KDEL (Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Leucin) verwendet.

Vorzugsweise wird die fusionierte Expressionskassette, die für ein DOXS-Gen kodiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19, kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren. Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie z.B. von Tabakpflanzen, verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden. Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15 - 38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die Expressionskassette integriertes Gen für die Expression eines DOXS-Gens enthalten.

Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine DOXS kodierenden DNA wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise

BNSDOCID: <WO___0008169A1_|_>

Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71 - 119 (1993) beschrieben.

Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3; SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5; SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 7 bzw. eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5 und SEQ-ID No. 7, oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Transformation von Pflanzen, -zellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Erhöhung des Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und Carotinoid-Gehaltes der Pflanze.

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Die Expressionskassette kann darüberhinaus auch zur Transformation von Bakterien, Cyanobakterien, Hefen, filamentösen Pilzen und Algen mit dem Ziel einer Erhöhung der Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll und/oder Carotinoid-Produktion eingesetzt werden.

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone - die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering

and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993) 128 - 143 sowie in Potrykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991) 205 - 225) beschrieben. Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984) 8711).

Mit einer Expressionskassette transformierte Agrobakterien können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie Getreide, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies, verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Funktionell äquivalente Sequenzen, die für ein DOXS-Gen kodieren, sind solche Sequenzen, welche trotz abweichender Nukleotidsequenz noch die gewünschten Funktionen besitzen. Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an den Kodon-Gebrauch einer Pflanze angepaßte, künstliche Nukleotid-Sequenzen.

Unter einem funktionellen Äquivalent versteht man insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten für eine DOXS kodierende Sequenz, welche weiterhin die gewünschte Funktion zeigen. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation der DOXS-Nukleotidsequenz erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen kodierenden Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-Schnittstellen sein.

Funktionelle Äquivalente sind auch solche Varianten, deren Funktion, verglichen mit dem Ausgangsgen bzw. Genfragment, abgeschwächt oder verstärkt ist.

Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie, wie oben beschrieben, die gewünschte Eigenschaft beispielsweise der Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes in der Pflanze durch Überexpression des DOXS-Gens in Kulturpflanzen vermitteln. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rücküber-

BNSDOCID: <WO___0008169A1_I_>

setzung mittels Molecular Modelling konstruierter Proteine, die DOXS Aktivität aufweisen oder durch *in vitro*-Selektion ermittelt werden. Besonders geeignet sind kodierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für die Wirtspflanze spezifischen Kodon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann ein mit pflanzengenetischen Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden Pflanze leicht ermitteln.

Als weitere geeignete äquivalente Nukleinsäure-Sequenzen sind zu nennen Sequenzen, welche für Fusionsproteine kodieren, wobei Bestandteil des Fusionsproteins ein pflanzliches DOXS-Polypeptid oder ein funktionell äquivalenter Teil davon ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann z.B. ein weiteres Polypeptid mit enzymatischer Aktivität sein oder eine antigene Polypeptidsequenz mit deren Hilfe ein Nachweis auf DOXS-Expression möglich ist (z.B. myc-tag oder his-tag). Bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um eine regulative Proteinsequenz, wie z.B. ein Signal- oder Transitpeptid, das das DOXS-Protein an den gewünschten Wirkort leitet.

Gegenstand der Erfindung sind aber auch die erfindungsgemäß erzeugten Expressionsprodukte sowie Fusionsproteine aus einem Transitpeptid und einem Polypeptid mit DOXS-Aktivität.

Erhöhung des Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll und/oder Carotinoid-Gehaltes bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten Biosyntheseleistung dieser Verbindungen durch funktionelle Überexpression des DOXS-Gens in der Pflanze gegenüber der nicht gentechnisch modifizierten Pflanze für die Dauer mindestens einer Pflanzengeneration.

Der Biosyntheseort von Tocopherol ist im allgemeinen das Blattgewebe, so daß eine blattspezifische Expression des DOXS-Gens sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, daß die Tocopherol-Biosynthese nicht auf das Blattgewebe beschränkt sein muß, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze - beispielsweise in fetthaltigen Samen - gewebespezifisch erfolgen kann.

Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression des exogenen DOXS-Gens von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare Expression wünschenswert erscheinen.

Die Wirksamkeit der Expression des transgen exprimierten DOXS-Gens kann beispielsweise *in vitro* durch Sproßmeristemvermehrung ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des DOXS-Gens und deren Auswirkung auf die Tocopherol-

Biosyntheseleistung an Testpflanzen in Gewächshausversuchen getestet werden.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, transformiert mit einer Expressionskassette enthaltend die Sequenz SEQ-ID No.1 oder SEQ-ID No. 3; SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-No. 5; SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 7 bzw. eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5 und SEQ-ID No. 7, oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Gerste, Weizen, Roggen, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies.

Pflanzen im Sinne der Erfindung sind mono- und dikotyle Pflanzen oder Algen.

Um effiziente Hemmstoffe der DOXS finden zu können, ist es notwendig, geeignete Testsysteme, mit denen Inhibitor-Enzym-Bindungsstudien durchgeführt werden können, zur Verfügung zu stellen. Hierzu wird beispielsweise die komplette cDNA-Sequenz der DOXS aus Arabidopsis in einen Expressionsvektor (pQE, Qiagen) kloniert und in *E. coli* überexprimiert.

Das mit Hilfe der Expressionskassette exprimierte DOXS-Protein eignet sich besonders zur Auffindung von für die DOXS spezifischen Hemmstoffen.

Dazu kann die DOXS beispielsweise in einem Enzymtest eingesetzt werden, bei dem die Aktivität der DOXS in An- und Abwesenheit des zu testenden Wirkstoffs ermittelt wird. Aus dem Vergleich der beiden Aktivitätsbestimmungen läßt sich eine qualitative und quantitative Aussage über das Hemmverhalten des zu testenden Wirkstoffes machen. Methoden zur Aktivitätsbestimmung der DOXS sind beschrieben (Putra et. al., Tetrahedron Letters 39 (1998), 23-26; Sprenger et al., PNAS 94 (1997), 12857-12862).

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Testsystems kann eine Vielzahl von chemischen Verbindungen schnell und einfach auf hemmende Eigenschaften überprüft werden. Das Verfahren gestattet es, reproduzierbar aus einer großen Anzahl von Substanzen gezielt solche mit großer Wirkstärke auszuwählen, um mit diesen Substanzen anschließend weitere, dem Fachmann geläufige vertiefte Prüfungen durchzuführen.

BNSDOCID: <WO___0008169A1_I_>

Durch Überexpression der für eine DOXS kodierenden Gensequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 in einer Pflanze kann prinzipiell eine erhöhte Resistenz gegenüber Inhibitoren der DOXS erreicht werden. Die derart hergestellten transgenen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

- Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man eine Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 oder eine mit dieser hybridisierende DNA-Sequenz in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzen einbringt.

- Verwendung einer Pflanze zur Herstellung pflanzlicher DOXS.

- Verwendung der Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 oder eine mit dieser hybridisierende DNA-Sequenz zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Resistenz gegenüber Inhibitoren der DOXS durch verstärkte Expression einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 oder eine mit dieser hybridisierende DNA Sequenz.

- Verwendung der DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 oder einer mit dieser hybridisierenden DNA-Sequenz zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorphyll- und/oder Carotinoid-Gehalt durch Expression einer DOXS DNA-Sequenz in Pflanzen.

- Verwendung der Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 oder eine mit dieser hybridisierenden DNA Sequenz zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der DOXS.

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

Allgemeine Klonierungsverfahren

Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von E. coli Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring

Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt.

Die im folgenden verwendeten Bakterienstämme (*E. coli*, XL-I Blue) wurden von Stratagene bezogen. Der zur Pflanzentransformation verwendete Agrobakterienstamm (*Agrobacterium tumefaciens*, C58C1 mit dem Plasmid pGV2260 oder pGV3850kann) wurde von Deblaere et al. in (Nucl. Acids Res. 13 (1985) 4777) beschrieben. Alternativ können auch der Agrobakterienstamm LBA4404 (Clontech) oder andere geeignete Stämme eingesetzt werden. Zur Klonierung können die Vektoren pUC19 (Yanish-Perron, Gene 33 (1985), 103 - 119) pBluescript SK- (Stratagene), pGEM-T (Promega), pZerO (Invitrogen), pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711 - 8720) und pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990), 221 - 230) benutzt werden.

Sequenzanalyse rekombinanter DNA

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463 - 5467).

Beispiel 1

Herstellung der Arabidopsis thaliana DOXS-Transformationskonstrukte

Das Arabisopsis thaliana DOXS Gen wurde wie in Mandel et al. (1996) beschrieben als vollständige cDNA in den Vektor pBluescript KS- (Stratagene) kloniert.

Zur Herstellung von Überexpressionskonstrukten wurde ein 2.3 kb Fragment (mit F-23-C bezeichnet) über die pBluescript KS- HinclI (blunt-end) und SacI Schnittstellen isoliert. Diese Sequenz enthält die vollständige DOXS-cDNA inklusive Chloroplastentransitpeptid vom ATG-Startcodons bis zu einer EcoRI-Schnittstelle, die 80 bp stromabwärts des Stopcodons liegt. Dieses Fragment wurde über die Schnittstellen SmaI (blunt-end) und SacI in den pBIN 19 3X35S Vektor (Abbildung 3) kloniert (Bevan et al., 1980), der den 35S Promotor des Cauliflower Mosaik Virus (Franck et al., Cell 21(1), 285-294 (1980)) dreimal hintereinander angeordnet enthält.

Zur Herstellung von Antisense-Konstrukten wurde ein Bereich des 3'-Endes der cDNA (mit F-23-C Antisense bezeichnet) in den oben erwähnten pBIN19-3X35S-Vektor kloniert. Ein Teil des 5'-Bereichs der DOXS-cDNA in pBluescript KS- wurde über HinclI und die DOXS-

interne BglII Schnittstelle verdaut und das entstandene Fragment entfernt. (Abbildung 4). Die BglII-Schnittstelle wurde über die Klenow-fill-in Reaktion (Klenow-Polymerase; Roche; nach Reaktion nach Herstellerprotokoll) aufgefüllt, so daß ein "blunt-end" entsteht. Die nun kompatiblen Enden (BglII-"blunt-end" und HinclII wurden ligiert. Nun wurde der 3'-Bereich der DOXS-cDNA über KpnI und XbaI (beide Schnittstellen liegen im Polylinker von pBluescript KS-5'- und 3'- der DOXS-cDNA) in Antisense-Orientierung in den oben beschriebenen pBIN19-Vektor in Antisense-Orientierung kloniert.

Die Transformationen von Arabidopsis thaliana Pflanzen mit den oben beschriebenen Konstrukten erfolgten mit Agrobakterium tumefaciens mit der Vakuum-Infiltrationsmethode (Bent et al., Science 265 (1994), 1856-1860). Mehrere unabhängige Transformanden wurden pro Konstrukt isoliert. Jeder Buchstabe (siehe Tabelle 1) bedeutet eine unabhängige transfomierte Linie. Aus der daraus erhaltenen T1-Generation wurden Pflanzen auf Homo-oder Heterozygotie untersucht. Mehrere Pflanzen jeder Linie wurden gekreuzt, um eine Segregationsanalyse durchzuführen. Die Nummer in der Tabelle 1 entspricht der individuellen Pflanze, welche für weitere Analysen ausgewählt wurde. Es wurden sowohl homo- als auch heterozygote Linien erhalten. Die Segregationsanalyse der erhaltenen Linien ist in der folgenden Tabelle 1 dargestellt:

Tabelle 1. Segregationsanalyse der transgenen DOXS-T2-Pflanzen

LINIEN	SEGREGATION
A9	75%
A19	100%
B11	75%
B4	100%
C2	100%
D3	75%
D17	100%
E9	75%
E14	100%
F9	75%
F14	100%

Beispiel 2

Isolierung genomischer DNA des Bakteriums Escherichia coli XL1 Blue

Eine Kultur von Escherichia coli XL1 Blue wurde in 300 ml Luria Broth-Medium für 12 Stunden bei 37°C angezogen. Aus dieser Kultur wurde die genomische DNA des Bakteriums isoliert, indem diese zunächst bei 5000 Umdrehungen in einer Sorvall RC50-Fuge pelletiert wurde. Anschliessend wurde das Pellet in 1/30 Volumen der Ursprungskultur Lysis-Puffer (25 mM EDTA, 0,5% SDS; 50 mM Tris HCl, pH 8,0) resuspendiert. Ein gleiches Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurde zugegeben und bei 70 Grad 10 Minuten inkubiert. Anschliessend wurde in einer Heraeus Untertisch-Zentrifuge bei 3500 U 15 Minuten die wässrige Phase von der phenolischen getrennt. Der wässrige Überstand wurde mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 8 M Lithiumchlorid versetzt und die Nukleinsäuren bei Raumtemperatur für 10 Minuten gefällt. Das Pellet wurde anschliessend in 400 µl TE/RNAse aufgenommen und bei 37 Grad für 10 Minuten inkubiert. Die Lösung wurde erneut mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) ausgeschüttelt und der Überstand gefällt mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 8 M Lithiumchlorid. Das Pellet wurde anschliessend mit 80% Ethanol gewaschen und in 400 µl TE/RNAse aufgenommen.

Beispiel 3

Isolierung der DOXS aus E. coli

Von der DNA-Sequenz der DOXS (Acc. Number AF035440) wurden für eine PCR Oligonukleotide abgeleitet, denen am 5'-Ende eine BamHI und am 3'-Ende eine XbaI bzw. eine weitere BamHI Restriktionsschnittstelle angefügt wurde. Das Oligonukleotid am 5' Ende umfaßt die Sequenz 5'-ATGGATCC*ATGAGTTTT-GATATTGCCAAATAC*-3' (Nukleotide 1-24 der DNA-Sequenz; kursiv geschrieben) beginnend mit dem ATG-Startcodon des Gens, das Oligonukleotid am 3'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-ATTCTAGA*TTATGCCAGCCAGGCCTTG*-3' bzw. 5'-ATGGATCC*TTATGCCAGCCAGGCCTTG*-3' (Nukleotide 1845-1863 der revers komplementären DNA-Sequenz; kursiv geschrieben) beginnend mit dem Stop-Kodon des Gens. Die PCR-Reaktion mit den beiden BamHI enthaltenden Oligonukleotiden wurde durchgeführt mit der Pfu-Polymerase (Stratagene GmbH, Heidelberg) nach Herstellerangaben. Als Template wurden 500 ng der genomischen DNA aus E. coli eingesetzt. Das PCR-Programm lautete:

5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 52°C, 2 min 72°C;
5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 48°C, 2 min 72°C;

BNSDOCID: <WO___0008169A1_I_>

25 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 44°C, 2 min 72°C

Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script (Stratagene GmbH, Heidelberg) kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung festgestellt. Das Fragment wurde BamHI aus dem PCR-Script-Vektor isoliert und in einen entsprechend geschnittenen Bin19-Vektor ligiert, der zusätzlich das Transitpeptid der Transketolase aus Kartoffel hinter dem CaMV 35S Promotor enthält. Das Transitpeptid gewährleistet die plastidäre Lokalisierung. Die Konstrukte sind in Abbildung 5 und 6 dargestellt und die Fragmente haben die folgende Bedeutung:

Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus). Fragment B (259 bp) beinhaltet das Transitpeptid der Transketolase. Fragment E beinhaltet das Gen der DOXS. Fragment D (192 bp) enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination.

Die PCR-Reaktion mit den 5'-BamHI und 3'-XbaI enthaltenden Oligonukleotiden wurde durchgeführt mit Taq-Polymerase (Takara, Sosei Co., Ltd.) nach Herstellerangaben. Als Template wurden 500 ng der genomischen DNA aus E. coli eingesetzt. Das PCR-Programm lautete:

5 Zyklen: 4 sec 94°C, 4 sec 50°C, 2 min 30°C
5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 46°C, 2 min 68°C
25 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 42°C, 2 min 68°C

Das Fragment wurde mit dem Gene-Clean-Kit gereinigt und in den Vektor pGemT (Promega GmbH, Mannheim) ligiert. Es wurde als BamHI/XbaI-Fragment in einen entsprechend geschnittenen pBin19AR-Vektor hinter den CaMV 35S Promotor kloniert. Die Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft (SEQ-ID No. 3).Dabei wurden zwei nicht konservative Basenaustausche festgestellt, die im Vergleich zur veröffentlichten Sequenz zur Veränderung der Aminosäure 152 (Asparagin) in Valin und Aminosäure 330 (Cystein) in Tryptophan führen.

Beispiel 4

Nachweis erhöhter DOXS-RNA-Mengen in transgenen Pflanzen

Gesamt RNA aus 15 Tage alten Keimlingen verschiedener transgener Linien, welche das DOXS-Überexpressionskonstrukt besitzen, wurde nach der Methode von Logeman et al., Anal.Biochem. 163, 16-20

(1987) extrahiert, in einem 1.2% Agarosegel aufgetrennt, auf Filter transferiert und mit einem 2.1 kb langen DOXS-Fragment als Sonde hybridisiert (Abbildung 7).

Beispiel 5

Nachweis erhöhter DOXS-Protein-Mengen in transgenen Pflanzen

Gesamtprotein (Abbildung 8) aus 15 Tage alten Keimlingen verschiedener, unabhängiger transgener Pflanzen, welche das DOXS-Überexpressionskonstrukt besitzen, wurde isoliert und mit einem polyklonalen Anti-DOXS-Antikörper (IgG) in einer Westernanalyse detektiert (Abbildung 9).

Beispiel 6

Messung des Carotinoid- und Chlorophyllgehalts

Die Bestimmung der Gesamtcarotinoid- und Chlorophyllmengen wurde wie in Lichtenthaler und Wellburn (1983) beschrieben mit 100% Acetonextrakten durchgeführt. Die Ergebnisse der Mehrfachmessungen der transgenen Linien, welche das DOXS-Überexpressionskonstrukt besitzen, sind in der folgenden Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Gesamtcarotinoid- und Chlorophyllgehalt der transgenen DOXS-Linien

LINIE	% GESAMT CHLOROPHYLLE	% GESAMT CAROTINOIDE
cla1 Mutante	5	5
Wild Typ	100	100
B-4	86	89
B-11	84	90
C-2	98	107
D-3	128	135
D-17	136	149
E-14	121	139
F-7	80	90
F-14	85	107

BNSDOCID: <WO___0008169A1_I_>

Beispiel 7

Transformation von Raps

Die Herstellung der transgenen Rapspflanzen orientiert sich an einem Protokoll von Bade, JB und Damm, B (in Gene, Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38), in welchem auch die Zusammensetzung der verwendeten Medien angegeben sind. Die Transformationen erfolgten mit dem Agrobacterium Stamm LBA4404 (Clontech). Als binäre Vektoren wurden die bereits oben beschriebenen pBIN19-Konstrukte mit der gesamten DOXS-cDNA verwendet. In diesen pBIN-Vektoren wurde die NOS-Terminatorsequenz durch die OCR-Terminatorsequenz ersetzt. Brassica napus Samen wurden mit 70 % (v/v) Ethanol oberflächensteril gemacht, 10 min in 55°C H_2O gewaschen, in 1%iger Hypochlorit-Lösung (25 % v/v Teepol, 0,1 % v/v Twenn 20) für 20 min inkubiert und sechsmal mit sterilem H_2O für jeweils 20 min gewaschen. Die Samen wurden drei Tage auf Filterpapier getrocknet und 10-15 Samen in einem Glasskolben mit 15 ml Keimungsmedium zur Keimung gebracht. Von mehreren Keimlingen (ca. 10 cm groß) wurden die Wurzeln und Apices entfernt und die verbleibenden Hypokotyle in ca. 6 mm lange Stücke geschnitten. Die so gewonnenen ca. 600 Explante werden 30 min mit 50 ml Basalmedium gewaschen und in einen 300 ml Kolben überführt. Nach Zugabe von 100 ml Kallus-Induktionsmedium wurden die Kulturen für 24 h bei 100 U/min inkubiert.

Vom Agrobacterium-Stamm wurde eine Übernachtkultur bei 29°C in LB mit Kanamycin (20 mg/l) angesetzt, davon 2 ml in 50 ml LB ohne Kanamycin für 4 h bei 29°C bis zu einer OD_{600} von 0,4-0,5 inkubiert. Nach der Pelletierung der Kultur bei 2000 U/min für 25 min wurde das Zellpellet in 25 ml Basalmedium resuspendiert. Die Konzentration der Bakterien in der Lösung wurde durch Zugabe von weiterem Basalmedium auf eine OD600 von 0.3 eingestellt.

Aus den Raps-Explanten wurde das Kallus-Induktionsmedium mit sterilen Pipetten entfernt, 50 ml Agrobacterium-Lösung hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 20 min inkubiert. Die Agrobacterien-Suspension wurde entfernt, die Raps-Explante für 1 min mit 50 ml Kallus-Induktionsmedium gewaschen und anschließend 100 ml Kallus-Induktionsmedium hinzugefügt. Die Co-Kultivierung wurde für 24 h auf einem Rotationsschüttler bei 100 U/min durchgeführt. Die Co-Kultivierung wurde durch Wegnahme des Kallus-Induktionsmediums gestoppt und die Explante zweimal für jeweils 1 min mit 25 ml und zweimal für 60 min mit jeweils 100 ml Waschmedium bei 100 U/min gewaschen. Das Waschmedium mit den Explanten wurde in 15 cm Petrischalen überführt und das Medium mit sterilen Pipetten ent-

fernt. Zur Regeneration wurden jeweils 20-30 Explanten in 90 mm Petrischalen überführt, welche 25 ml Sproß-Induktionsmedium mit Kanamycin enthielten. Die Petrischalen wurden mit 2 Lagen Leukopor verschlossen und bei 25°C und 2000 lux bei Photoperioden von 16/8 H inkubiert. Alle 12 Tage wurde die sich entwickelnden Kalli auf frische Petrischalen mit Sproß-Induktionsmedium überführt. Alle weiteren Schritte zur Regeneration ganzer Pflanzen wurde wie von Bade, J.B. und Damm, B. (in Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G.,eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38) beschrieben durchgeführt.

Beispiel 8

Steigerung der Tocopherolbiosynthese in Raps

Die cDNA der DOXS (SEQ-ID No. 1) wurde mit einem CaMV35S-Promotor versehen und in Raps unter Verwendung des 35S-Promotors überexprimiert. Parallel dazu wurde der samenspezifische Promotor des Phaseolingenes verwednet, um den Tocopherolgehalt spezifisch im Rapssamen zu erhöhen. Mit den entsprechenden Konstrukten transfomierte Rapspflanzen wurden im Gewächshaus angezogen. Anschließend wurde der α-Tocopherolgehalt der Gesamtpflanze bzw. der Samen der Pflanze bestimmt. In allen Fällen war die α-Tocopherolkonzentration im Vergleich zur nicht transfomierten Pflanze erhöht.

Beispiel 9

Nachweis der Expression der DOXS aus E. coli in transgenen Tabakpflanzen

Von Pflanzen, die das Konstrukt pBinAR HPPD-DOXS enthielten, wurden Blattscheiben mit einem Durchmesser von 0,9 cm aus völlig entfalteten Blättern genommen und in flüssig Stickstoff eingefroren. Das Blattmaterial wurde in einem HEPES-KOH-Puffer, der Proteinase-Inhibitoren enthielt homogenisiert und aus dem Extrakt mit dem Protein-Assay von Bio-Rad nach Herstellerangaben die Proteinkonzentration bestimmt. 45 µg Protein wurden von jedem Extrakt mit einem Volumen Auftragpuffer (Laemmli, 1970) versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine auf einem 12,5 prozentigen SDS-PAGE Gel aufgetrennt. Danach wurden die Proteine mittels Semi-dry Elektroblots auf Porablotmembran (Machery und Nagel) übertragen. Die Detektion des DOXS-Proteins erfolgte mittels eines Antikörpers gegen die E. coli DOXS aus Kaninchen. Die Farbreaktion basiert auf der Bindung eines sekundären Antikörpers und einer alkalischen Phosphatase, die NBT/BCIP zu einem Farbstoff umsetzt. Sekundärer Antikörper und alkalische

BNSDOCID: <WO___0008169A1_I_>

Phosphatase stammen von Pierce, die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

Die Abbildung 10 zeigt den Nachweis des DOXS-Proteins in Blättern transgener Pflanzen. 1: Marker; 2: Pflanze 10; 3:62; 4: 63; 5: 69; 7:71; 8:112; 9:113; 10:116; 11:WT1; 12:WT2; 13:100ng rekombinantes Protein; 14:50 ng rekombinantes Protein; 15: 10 ng rekombinantes Protein.

Beispiel 10

Klonierung des Gens einer HPPD aus Streptomyces avermitilis U11864

Isolierung genomischer DNA des Bakteriums Streptomyces avermitilis U11864:

Eine Kultur von Streptomyces avermitilis U11864 wurde in 300 ml YEME-Medium (5 g Malz-Extrakt, 2 g Hefe-Extrakt, 2 g Glukose) für 96 h bei 28°C angezogen. Aus dieser Kultur wurde die genomische DNA des Bakteriums isoliert, indem diese zunächst bei 5000 U in einer Sorvall RC5C-Fuge pelletiert wurde. Anschliessend wurde das Pellet in 1/30 Volumen Lysis-Puffer (25 mM EDTA, 0,5 % SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) resuspendiert. Ein gleiches Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurde zugegeben und bei 70°C 10 Minuten inkubiert. Anschliessend wurde in einer Heraeus Untertisch-Zentrifuge bei 3500 U 15 Minuten die wässrige Phase von der phenolischen getrennt. Der wässrige Überstand wurde mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 8 M Lithiumchlorid versetzt und die Nukleinsäuren bei Raumtemperatur für 10 Minuten gefällt. Das Pellet wurde anschliessend in 400 µl TE/RNAse aufgenommen und bei 37 Grad für 10 Minuten inkubiert. Die Lösung wurde erneut mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) ausgeschüttelt und der Überstand gefällt mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 8 M Lithiumchlorid. Das Pellet wurde anschließend mit 80% Ethanol gewaschen und in 400 µl TE/RNAse aufgenommen.

Von der DNA-Sequenz der HPPD aus Streptomyces avermitilis (Denoya et al, 1994; Acc. Number U11864) wurden für eine PCR Oligonukleotide abgeleitet, denen am 5'-Ende eine BamHI und am 3'-Ende eine XbaI Restriktionsschnittstelle angefügt worden war. Das Oligonukleotid am 5'-Ende umfasst die Sequenz 5'-GGA*TCCAGCGGA*-*CAAGCCAAC*-3' (37 bis 55 Basen vom ATG in 5'-Richtung entfernt; kursiv geschrieben), das Oligonukleotid am 3'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-TCTAGA*TTATGCCAGCCAGGCCTTG*-3' (Nukleotide 1845-1863 der revers komplementären DNA-Sequenz; Kursiv geschrieben).

Die PCR-Reaktion wurde durchgeführt mit Pfu-Polymerase (Stratagene GmbH, Heidelberg) nach Herstellerangaben. Als Vorlage wurden 400 ng der genomischen DNA eingesetzt. Das PCR-Programm lautete:

5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 54°C, 2 min 72°C
5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 52°C, 2 min 72°C
25 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 50°C, 2 min 72°C

Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangeben in den Vektor PCR-Script (Stratagene GmbH, Heidelberg) kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Dabei wurde festgestellt, daß das isolierte Gen für eine zusätzliche Aminosäure kodiert. Es enthält die drei Basen TAC (kodierend für Tyrosin), vor dem Nukleotid N429 der zitierten Sequenz (Denoya et al., 1994).

Das Fragment wurde mit einem BamHI und XbaI Verdau aus dem Vektor isoliert und in einen entsprechend geschnittenen Bin19AR-Vektor hinter den CaMV 35S Promotor ligiert, zur Expression des Gens im Zytosol. Aus dem gleichen PCR-Script-Vektor wurde das Gen als BamHI-Fragment isoliert und in einen entsprechend geschnittenen pBin19-Vektor ligiert, der hinter dem CaMV 35S Promotor noch zusätzlich das Transitpeptid der plastidären Transketolase aus Kartoffel enthält. Das Transitpeptid gewährleistet die plastidäre Lokalisierung. Die Konstrukte sind in Abbildung 11 und 12 dargestellt und die Fragmente haben folgende Bedeutung:

Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus). Fragment B (259 bp) beinhaltet das Transitpeptid der Transketolase. Fragment C beinhaltet das Gen der HPPD. Fragment D (192 bp) enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen, J. et al., EMBO J. 3 (1984), 835-846) zur Transkriptionstermination.

Beispiel 11

Herstellung von Konstrukten zur Pflanzentransformation mit DOXS und HPPD-DNA-Sequenzen

Zur Herstellung von Pflanzen, welche transgen für die DOXS und die HPPD sind, wurde ein binärer Vektor angefertigt, der beide Gensequenzen enthält (Abbildung 13). Die Gensequenzen der DOXS und der HPPD wurden jeweils als BamHI-Fragmente wie in Beispiel 3 und 10 beschrieben kloniert. Der Vektor pBinAR-Hyg enthält den 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus und das Polyadenylierungs-

signal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination. Der pBinAR-Hyg Vektor vermittelt in Pflanzen Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin und ist so geeignet, Pflanzen mit Kanamycinresistenz zu superinfizieren.

Zur Klonierung der HPPD in Vektoren, welche zusätzlich noch eine andere cDNA enthalten, wurden für eine PCR Oligonukleotide abgeleitet, denen am 5'-Ende und am 3'-Ende eine BamHI Restriktionsschnittstelle angefügt worden war. Das Oligonukleotid am 5'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-GGA*TCCTCCAGCGGACAAGCCAAC*-3' (Nukleotide 37 bis 55 vom ATG in 5'-Richtung entfernt; Kursiv geschrieben), das Oligonukleotid am 3'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-ATGGATC-*CCGCGCCGCCTACAGGTTG*-3' (endend mit Basenpaar 1140 der kodierenden Sequenz, beginnend 8 Basenpaare 3' des TAG Stop-Codons; Kursiv geschrieben). Die PCR-Reaktion wurde durchgeführt mit Tli-Polymerase (Promega GmbH, Mannheim) nach Herstellerangaben. Als Template wurden 10 ng des Plasmids pBinAR-HPPD eingesetzt. Das PCR-Programm lautete:

5 Zyklen: 94°C 4 sec, 68°C 30 sec, 72°C 2 min
5 Zyklen: 94°C 4 sec, 64°C 30 sec, 72°C 2 min
25 Zyklen: 94°C 4 sec, 60°C 30 sec, 72°C 2 min

Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script (Stratagene GmbH, Heidelberg) kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus dem Vektor PCR-Script wurde es als BamHI-Fragment ausgeschnitten und in einen entsprechend geschnittenen pBinAR-Vektor ligiert, der zusätzlich das Transitpeptid der Transketolase enthält, zur Einführung des Genprodukts in den Plastiden. Es entstand das Plasmid pBinAR-TP-HPPD (Abbildung 12).

Zur Klonierung wurde aus dem Plasmid pBinAR-TP-HPPD der 35S-Promotor, das Transketolase-Transitpeptid, das HPPD-Gen und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination mittels PCR isoliert. Den Oligonukleotiden für den Promotor und den Terminator wurde jeweils eine HindIII-Schnittstelle angefügt. Die Sequenz des Oligonukleotids, welches sich an den 5'-Bereich des Promotors (kursiv geschrieben) anlagert, lautet 5'-ATAAGCTT-*CATGGAGTCAAA-GATTCAAATAGA*-3', die des Oligonukleotids, welches sich an die Terminationssequenz (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATAAGCTT*GGACAATCAGTAAATTGAACGGAG*-3'. Das erhaltene Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script

(Stratagene GmbH, Heidelberg) kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft (SEQ-ID No. 5). Aus diesem PCR-Script-Vektor wurde es als HindIII-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor pBin19 (Bevan, 1984, Nucleic Acids Res. 12, 8711-8721) übertragen.

Aus dem Plasmid pBinAR-TP-DOXS wurde der 35S-Promotor, das Transketolase-Transitpeptid, das DOXS-Gen und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination mittels PCR isoliert. Den Oligonukleotiden für den Promotor und die Terminatorsequenz wurde jeweils eine EcoRI-Schnittstelle angefügt. Die Sequenz des Oligonukleotids, welches sich an den Promotor (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATGAATTC*CATGGAGTCAAAGATTCAAATAGA*-3', die des Oligonukleotids, welches sich an die Terminatorsequenz (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATGAATTC*GGACAATCAGTAAATTGAA-CGGA-G*-3'. Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script (Stratagene GmbH, Heidelberg) kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft (SEQ-ID No. 3). Aus dem PCR-Script Vektor wurde es als EcoRI-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor pBin19 (Bevan, 1984) übertragen.

Aus dem PCR-Script Vektor wurde es als XbaI-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor übertragen, der wie oben beschrieben bereits die Sequenz der HPPD enthielt. Es entstand das Konstrukt pBinAR-HPPD-DOXS (Abbildung 13), dessen Fragmente folgende Bedeutung haben:

Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437). Fragment B enthält das Transitpeptid der plastidären Transketolase. Fragment C enthält das Gen der HPPD. Fragment D enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination. Fragment E enthält das Gen der DOXS.

Beispiel 12

Herstellung von transgenen Tabakpflanzen
(Nicotiana tabacum L. cv. Samsun NN)

Für die Herstellung transgener Tabakpflanzen, die einen veränderten Prenyllipidgehalt aufweisen, wurden Tabakblattscheiben mit Sequenzen der DOXS und der HPPD transformiert. Zur Transformation von Tabakpflanzen wurden 10 ml einer unter Selektion gewachsenen Übernachtkultur von Agrobacterium tumefaciens abzentrifugiert,

der Überstand verworfen und die Bakterien in gleichem Volumen Antibiotika-freien Mediums resuspendiert. In einer sterilen Petrischale wurden Blattscheiben steriler Pflanzen (Durchmesser ca. 1 cm) in dieser Bakteriensuspension gebadet. Anschließend wurden die Blattscheiben in Petrischalen auf MS-Medium (Murashige und Skoog, Physiol. Plant (1962) 15, 473) mit 2% Saccharose und 0.8% Bacto-Agar ausgelegt. Nach 2-tägiger Inkubation im Dunkeln bei 25°C wurden sie auf MS-Medium mit 100mg/l Kanamycin, 500mg/l Claforan, 1mg/l Benzylaminopurin (BAP), 0.2mg/l Naphtylessigsäure (NAA), 1.6% Glukose und 0.8% Bacto-Agar übertragen und die Kultivierung (16 Stunden Licht / 8 Stunden Dunkelheit) fortgesetzt. Wachsende Sprosse wurden auf hormonfreies MS-Medium mit 2% Saccharose, 250mg/l Claforan und 0.8% Bacto-Agar überführt.

Beispiel 13

Herstellung von transgenen Rapspflanzen (Brassica napus)

Die Herstellung der transgenen Rapspflanzen, die einen veränderten Prenyllipidgehalt aufweisen, orientierte sich an einem Protokoll von Bade, J.B. und Damm, B. (in Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38), in welchem auch die Zusammensetzungen der verwendeten Medien und Puffer angegeben sind.

Die Transformationen erfolgten mit dem Agrobacterium tumefaciens Stamm LBA4404 (Clontech GmbH, Heidelberg). Als binäre Vektoren wurden die bereits oben beschriebenen binären Konstrukte mit den gesamten cDNAs der DOXS und der HPPD verwendet. In allen hier verwendeten binären Vektoren wurde die NOS-Terminatorsequenz durch das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionsterminination ersetzt. Brassica napus Samen wurden mit 70% (v/v) Ethanol oberflächensteril gemacht, 10 min bei 55°C in H_2O gewaschen, in 1%iger Hypochlorit-Lösung (25% v/v Teepol, 0,1% v/v Tween 20) für 20 min inkubiert und sechsmal mit sterilem H_2O für jeweils 20 min gewaschen. Die Samen wurden drei Tage auf Filterpapier getrocknet und 10-15 Samen in einem Glasskolben mit 15 ml Keimungsmedium zur Keimung gebracht. Von mehreren Keimlingen (ca. 10 cm groß) wurden die Wurzeln und Apices entfernt und die verbleibenden Hypokotyle in ca. 6 mm lange Stücke geschnitten. Die so gewonnenen ca. 600 Explante werden 30 min mit 50 ml Basalmedium gewaschen und in einen 300 ml Kolben überführt. Nach Zugabe von 100 ml Kallus-Induktionsmedium wurden die Kulturen für 24 h bei 100 U/min inkubiert.

BNSDOCID: <WO___0008169A1_I_>

Vom Agrobacterium-Stamm wurde eine Übernachtkultur bei 29°C in Luria Broth-Medium mit Kanamycin (20 mg/l) angesetzt, davon 2 ml in 50 ml Luria Broth-Medium ohne Kanamycin für 4 h bei 29°C bis zu einer OD_{600} von 0,4 - 0,5 inkubiert. Nach der Pelletierung der Kultur bei 2000 U/min für 25 min wurde das Zellpellet in 25 ml Basalmedium resuspendiert. Die Konzentration der Bakterien in der Lösung wurde durch Zugabe von weiterem Basalmedium auf eine OD_{600} von 0.3 eingestellt.

Aus den Raps-Explanten wurde das Kallus-Induktionsmedium mit sterilen Pipetten entfernt, 50 ml Agrobacterium-Lösung hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 20 min inkubiert. Die Agrobacterien-Suspension wurde entfernt, die Raps-Explante für 1 min mit 50 ml Kallus-Induktionsmedium gewaschen und anschließend 100 ml Kallus-Induktionsmedium hinzugefügt. Die Co-Kultivierung wurde für 24 h auf einem Rotationsschüttler bei 100 U/min durchgeführt. Die Co-Kultivierung wurde durch Wegnahme des Kallus-Induktionsmediums gestoppt und die Explante zweimal für jeweils 1 min mit 25 ml und zweimal für 60 min mit jeweils 100 ml Waschmedium bei 100 U/min gewaschen. Das Waschmedium mit den Explanten wurde in 15 cm Petrischalen überführt und das Medium mit sterilen Pipetten entfernt.

Zur Regeneration wurden jeweils 20-30 Explante in 90 mm Petrischalen überführt, welche 25 ml Sproß-Induktionsmedium mit Kanamycin enthielten. Die Petrischalen wurden mit 2 Lagen Leukopor verschlossen und bei 25°C und 2000 lux bei Photoperioden von 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit inkubiert. Alle 12 Tage wurden die sich entwickelnden Kalli auf frische Petrischalen mit Sproß-Induktionsmedium überführt. Alle weiteren Schritte zur Regeneration ganzer Pflanzen wurde wie von Bade, J.B. und Damm, B. (in Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38) beschrieben durchgeführt.

Beispiel 14

Steigerung der Tocopherolbiosynthese in Raps

Die cDNA der DOXS (SEQ-ID No. 3) und der HPPD (SEQ-ID No. 5) wurde mit einem CaMV35S-Promotor versehen und in Raps unter Verwendung des 35S-Promotors überexprimiert. Parallel dazu wurde der samenspezifische Promotor des Phaseolingenes verwendet, um den Tocopherolgehalt spezifisch im Rapssamen zu erhöhen. Mit den entsprechenden Konstrukten transformierte Rapspflanzen wurden im Gewächshaus angezogen. Anschließend wurde der α-Tocopherolgehalt der Gesamtpflanze bzw. der Samen der Pflanze bestimmt. In allen

Fällen war die α-Tocopherolkonzentration im Vergleich zur nicht transfomierten Pflanze erhöht.

Beispiel 15

Klonierung des Gens einer GGPPOR aus Arabidopsis thaliana

Isolierung von Gesamt-RNA aus voll entfalteten Blättern von Arabidopsis thaliana:

Voll entfaltete Blätter von Arabidopsis thaliana wurden geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Material wurde anschließend im Mörser pulverisiert und in Z6-Puffer (8 M Guanidium-hydrochlorid, 20 mM MES, 20 mM EDTA pH 7,0) aufgenommen. Die Suspension wurde in Reaktionsgefäße überführt und mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1 ausgeschüttelt. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 15000 U/min wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1/20 Volumen 1N Essigsäure und 0,7 Volumen Ethanol (absolut) die RNA gefällt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet zunächst mit 3M Natriumacetatlösung gewaschen und nach einer weiteren Zentrifugation in 70% Ethanol. Anschließend wurde das Pellet in DEPC-Wasser gelöst und die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

Herstellung von cDNA aus gesamt RNA voll entfalteter Blätter von A. thaliana:

20 µg Gesamt-RNA wurden zunächst mit 3,3 µl 3M Natriumacetat-lösung und 2 µl 1M Magnesiumsulfatlösung versetzt und auf 100 µl Endvolumen mit DEPC Wasser aufgefüllt. Dazu wurde 1 µl RNase freie DNase (Boehringer Mannheim) gegeben und 45 min bei 37°C inkubiert. Nach Entfernen des Enzyms durch Ausschütteln mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol wurde die RNA mit Ethanol gefällt und das Pellet in 100 µl DEPC Wasser aufgenommen. 2,5 µg RNA aus dieser Lösung wurden mittels eines cDNA-Kits (Gibco, Life Technologies) in cDNA umgeschrieben.

Von der DNA-Sequenz der Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (Keller et al, Eur.J.Biochem.(1998)251(1-2),413-417); Accession Number Y14044) wurden für eine PCR Oligonukleotide abgeleitet, denen am 5'-Ende eine BamHI und am 3'-Ende eine SalI Restriktionsschnittstelle angefügt worden war. Das Oligonukleotid am 5'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-ATGGATCC*ATGGCGACGACGGTTACACTC*-3' beginnend mit dem ersten Kodon der cDNA (kursiv gedruckt), das Oligonukleotid am 3'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-ATGTCGAC*GTGATGA*-

BNSDOCID: <WO___0008169A1_I_>

TAGATTACTAACAGAC-3' beginnend mit dem Basenpaar 1494 der cDNA Sequenz (kursiv gedruckt).

Die PCR-Reaktion wurde durchgeführt mit Pfu-Polymerase von Stratagene GmbH, Heidelberg nach Herstellerangaben. Als Template wurde 1/8 Volumen der cDNA eingesetzt (entspricht 0,3 µg RNA). Das PCR-Programm lautete:

5 Zyklen: 94°C für 4 sec, 48°C für 30 sec, 72°C für 2 min
5 Zyklen: 94°C für 4 sec, 46°C für 30 sec, 72°C für 2 min
25 Zyklen: 94°C für 4 sec, 44°C für 30 sec, 72°C für 2 min

Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script von Stratagene GmbH, Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit des Fragments wurde durch Sequenzierung überprüft (SEQ ID No. 7). Mittels der durch die Primer an die Sequenz angefügten Restriktionsschnittstellen wurde das Gen als BamHI/SalI-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor BinAR-Hyg kloniert. Dieser enthält den 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984),835-846) zur Transkriptionstermination. Das Plasmid vermittelt in Pflanzen Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin und ist so geeignet, Pflanzen mit Kanamycinresistenz zu superinfizieren. Da das Plastidentransitpeptid der GGPPOR mitkloniert wurde, sollte das Protein in transgenen Pflanzen in die Plastiden transportiert werden. Das Konstrukt ist in Abbildung 14 dargestellt. Die Fragmente haben die folgende Bedeutung:

Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus). Fragment D enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination. Fragment F enthält das Gen der GGPPOR inklusive der intrinsischen Plastidentransitsequenz.

Beispiel 16

Herstellung von Konstrukten zur Pflanzentransformation mit DOXS und GGPPOR Sequenzen

Zur Herstellung von Pflanzen, welche transgen für die DOXS und die GGPPOR sind wurde ein binärer Vektor angefertigt, der beide Gensequenzen enthält (Abbildung 15). Das GGPPOR-Gen mit der intrinsischen Plastidenlokalisationssequenz wurde (wie in Beispiel 15 beschrieben) als BamHI/SalI-Fragment in den entsprechend

BNSDOCID: <WO__0008169A1_I_>

geschnittenen Vektor pBinAR-Hyg kloniert. Das Gen der DOXS wurde als BamHI-Fragment wie in Beispiel 3 beschrieben kloniert. Der Vektor pBinAR-Hyg enthält den 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination. Dieses Plasmid vermittelt in Pflanzen Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin und ist so geeignet, Pflanzen mit Kanamycinresistenz zu superinfizieren.

Aus dem Plasmid pBinAR-TP-DOXS wurde der 35S-Promotor, das Transketolase-Transitpeptid, das DOXS-Gen und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination mittels PCR isoliert. Den Oligonukleotiden für den Promotor und die Terminatorsequenz wurde jeweils eine EcoRI-Schnittstelle angefügt. Die Sequenz des Oligonukleotids, welches sich an den Promotor (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATGAATTC*CATGGAGTCAAAGATTCAAATAGA*-3', die des Oligonukleotids, welches sich an die Terminatorsequenz (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATGAATTC*GGACAATCAGTAAATTGAACGGA*-*G*-3'. Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script von Stratagene GmbH, Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus dem PCR-Script Vektor wurde es als EcoRI-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor pBin19 (Bevan, Nucleic Acids Res.12(1984), 8711-8721) übertragen.

Aus dem Plasmid pBinARHyg-GGPPOR wurde der 35S-Promotor, das GGPPOR-Gen und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination mittels PCR isoliert. Den Oligonukleotiden für den Promotor und den Terminator wurde jeweils eine XbaI-Schnittstelle angefügt. Die Sequenz des Oligonukleotids, welches sich an den Promotor (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATTCTAGA*CATG-GAGTCAAA-GATTCAAATAGA*-3', die des Oligonukleotids, welches sich an die Terminatorsequenz (Kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATTCTAGA*GGACAA-TCAGTAAATTGAACGGAG*-3'. Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script von Stratagene GmbH, Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus dem PCR-Script Vektor wurde es als XbaI-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor übertragen, welcher bereits wie oben beschrieben die Sequenz der DOXS enthielt. Es entstand das Konstrukt pBinAR-DOXS-GGPPOR (Abbildung 15), dessen Fragmente folgende Bedeutung haben:

Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus). Fragment B enthält das Transitpeptid der plastidären Transketolase . Fragment E enthält das Gen der DOXS. Fragment D enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionsterminationation. Fragment F enthält das Gen der GGPPOR inklusive der intrinsischen Plastidentransitsequenz.

Beispiel 17

Herstellung von Konstrukten zur Pflanzentransformation mit DOXS-, GGPPOR- und HPPD-DNA-Sequenzen

Zur Herstellung von Pflanzen, welche transgen für die DOXS, die GGPPOR und die HPPD sind, wurde ein binärer Vektor angefertigt, der alle drei Gensequenzen enthält (Abbildung 16). Das GGPPOR-Gen war mit der intrinsischen Plastidenlokalisationssequenz versehen (wie in Beispiel 15 beschrieben). Der verwendete pBinAR-Hyg Vektor vermittelt in Pflanzen Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin und ist so geeignet, Pflanzen mit Kanamycinresistenz zu superinfizieren.

Zur Klonierung der HPPD in Vektoren, welche zusätzlich noch eine andere cDNA enthalten, wurden für eine PCR Oligonukleotide abgeleitet, denen am 5'-Ende und am 3'-Ende eine BamHI Restriktionsschnittstelle angefügt worden war. Das Oligonukleotid am 5'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-GGA*TCCTCCAGCGGACAAGCCAAC*-3' (Nukleotide 37 bis 55 vom ATG in 5'-Richtung entfernt; Kursiv geschrieben), das Oligonukleotid am 3'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-ATGGATC-*CCGCGCCGCCTACAGGTTG*-3' (endend mit Basenpaar 1140 der kodierenden Sequenz, beginnend 8 Basenpaare 3' des TAG Stopp-Codons; Kursiv geschrieben). Die PCR-Reaktion wurde durchgeführt mit Tli-Polymerase von Promega GmbH, Mannheim nach Herstellerangaben. Als Template wurden 10 ng des Plasmids pBinAR-HPPD eingesetzt. Das PCR-Programm lautete:

5 Zyklen: 94°C 4 sec, 68°C 30 sec, 72°C 2 min
5 Zyklen: 94°C 4 sec, 64°C 30 sec, 72°C 2 min
25 Zyklen: 94°C 4 sec, 60°C 30 sec, 72°C 2 min

Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script von Stratagene GmbH, Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus dem Vektor PCR-Script wurde es als BamHI-Fragment ausgeschnitten und in einen entsprechend geschnittenen pBinAR-Vektor ligiert, der zusätzlich das

Transitpeptid der Transketolase enthält, zur Einführung des Genprodukts in den Plastiden. Es entstand das Plasmid pBinAR-TP-p-HPPD.

Zur Klonierung wurde aus dem Plasmid pBinAR-TP-HPPD der 35S-Promotor, das Transketolase-Transitpeptid, das p-HPPD-Gen und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al. 1984) zur Transkriptionstermination mittels PCR isoliert. Den Oligonukleotiden für den Promotor und den Terminator wurde jeweils eine HindIII-Schnittstelle angefügt. Die Sequenz des Oligonukleotids, welches sich an den 5'-Bereich des Promotors anlagert (kursiv geschrieben) lautet 5'-ATAAGCTT-*CATGGAGTCAAA-GATTCAAATAGA*-3', die des Oligonukleotids, welches sich an die Terminationssequenz (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATAAGCTT*GGAC-AATCAGTAAATTGAACGGAG*-3'. Das erhaltene Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script von Stratagene GmbH, Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus diesem PCR-Script-Vektor wurde es als HindIII-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor pBin19 (Bevan, 1984, Nucleic Acids Res. 12, 8711-8721) übertragen.

Aus dem Plasmid pBinAR-TP-DOXS wurde der 35S-Promotor, das Transketolase-Transitpeptid, das DOXS-Gen und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination mittels PCR isoliert. Den Oligonukleotiden für den Promotor und die Terminatorsequenz wurde jeweils eine EcoRI-Schnittstelle angefügt. Die Sequenz des Oligonukleotids, welches sich an den Promotor (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATGAATTC*CATGGAGTCAAAGATTCAAATAGA*-3', die des Oligonukleotids, welches sich an die Terminatorsequenz (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATGAATTC*GGACAATCAGTAAATTGAACGGA-G*-3'. Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script von Stratagene GmbH, Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus dem PCR-Script Vektor wurde es als EcoRI-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor übertragen, welcher bereits wie oben beschrieben die Sequenz der HPPD enthielt.

Aus dem Plasmid pBinARHyg-GGPPOR wurde der 35S-Promotor, das GGPPOR-Gen und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination mittels PCR isoliert. Den Oligonukleotiden für den Promotor und den Terminator wurde jeweils eine XbaI-Schnittstelle angefügt. Die Sequenz des Oligonukleotids, welches sich an den

BNSDOCID: <WO___0008169A1_I_>

Promotor (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATTCTAGA*CATG-GAGTCAAA-GATTCAAATAGA*-3', die des Oligonukleotids, welches sich an die Terminatorsequenz (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATTCTAGA*GGACAA-TCAGTAAATTGAACGGAG*-3'. Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script von Stratagene GmbH, Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus dem PCR-Script Vektor wurde es als XbaI-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor übertragen, welcher bereits wie oben beschrieben die Sequenzen der HPPD und der DOXS enthielt. Es entstand das Konstrukt pBinAR-DOXS-GGPPOR-HPPD (Abbildung 16), dessen Fragmente folgende Bedeutung haben:

Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus). Fragment B enthält das Transitpeptid der plastidären Transketolase. Fragment C enthält das Gen der HPPD. Fragment D enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination. Fragment E enthält das Gen der DOXS. Fragment F enthält das Gen der GGPPOR inklusive der intrinsischen Plastidentransitsequenz.

Beispiel 18

Steigerung der Tocopherolbiosynthese in Raps

Die cDNA der DOXS (SEQ-ID No. 3) und der GGPPOR (SEQ-ID No. 7) wurde mit einem CaMV35S-Promotor versehen und in Raps unter Verwendung des 35S-Promotors überexprimiert. Parallel dazu wurde der samenspezifische Promotor des Phaseolingenes verwendet, um den Tocopherolgehalt spezifisch im Rapssamen zu erhöhen. Mit den entsprechenden Konstrukten transformierte Rapspflanzen wurden im Gewächshaus angezogen. Anschließend wurde der α-Tocopherolgehalt der Gesamtpflanze bzw. der Samen der Pflanze bestimmt. In allen Fällen war die α-Tocopherolkonzentration im Vergleich zur nicht transfomierten Pflanze erhöht.

Beispiel 19

Steigerung der Tocopherolbiosynthese in Raps

Die cDNA der DOXS (SEQ-ID No. 3), der HPPD (SEQ-ID No. 5) und der GGPPOR (SEQ-ID No. 7) wurde mit einem CaMV35S-Promotor versehen und in Raps unter Verwendung des 35S-Promotors überexprimiert. Parallel dazu wurde der samenspezifische Promotor des Phaseolingenes verwendet, um den Tocopherolgehalt spezifisch im Rapssamen

zu erhöhen. Mit den entsprechenden Konstrukten transformierte Rapspflanzen wurden im Gewächshaus angezogen. Anschließend wurde der α-Tocopherolgehalt der Gesamtpflanze bzw. der Samen der Pflanze bestimmt. In allen Fällen war die α-Tocopherolkonzentration im Vergleich zur nicht transfomierten Pflanze erhöht.

Patentansprüche

1. Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt.

2. Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 oder einer mit dieser hybridisierenden DNA-Sequenz kodierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und/oder Carotinoiden.

3. Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) und codierend für eine p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt.

4. Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen kodierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) und eine p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und/oder Carotinoiden.

5. Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) und codierend für eine Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt.

6. Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und einer DNA-Sequenz SEQ ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen kodierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) und eine Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und/oder Carotinoiden.

7. Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS), codierend für eine Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD) und codierend für eine Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR) zur Her-

stellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt.

8. Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3, einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 5 und einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen kodierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS), eine Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD) und eine Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und/oder Carotinoiden.

9. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhte Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, dadurch gekennzeichnet, daß eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 oder eine mit dieser hybridisierende DNA-Sequenz in Pflanzen exprimiert wird.

10. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, dadurch gekennzeichnet, daß eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen in Pflanzen exprimiert werden.

11. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, dadurch gekennzeichnet, daß eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen in Pflanzen exprimiert werden.

12. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, dadurch gekennzeichnet, daß DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3, SEQ-ID No. 5 und SEQ-ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen in Pflanzen exprimiert werden.

13. Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man eine Expressionskassette enthaltend einen Promotor und eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzenzellen einbringt.

14. Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man eine Expressionskassette enthaltend einen Promotor und DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und

SEQ-ID No. 5 in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzenzellen einbringt.

15. Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man eine Expressionskassette enthaltend einen Promotor und DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 7 in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzenzellen einbringt.

16. Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man eine Expressionskassette enthaltend einen Promotor und DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3, SEQ-ID No. 5 und SEQ-ID No. 7 in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzenzellen einbringt.

17. Verfahren zur Transformation von Pflanzen gemäß Anspruch 13-16, dadurch gekennzeichnet, daß die Transformation mit Hilfe des Stammes Agrobacterium tumefaciens, der Elektroporation oder der particle bombardment Methode erfolgt.

18. Pflanze mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll und/oder Carotinoid-Gehalt enthaltend eine Expressionskassette gemäß Anspruch 13-16.

19. Pflanze nach Anspruch, ausgewählt aus der Gruppe Soja, Canola, Gerste, Hafer, Weizen, Raps, Mais oder Sonnenblume.

20. Verwendung der SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der DOXS.

21. Testsystem basierend auf der Expression einer Expressionskassette gemäß Anspruch 13 zur Identifizierung von Inhibitoren der DOXS.

22. Verwendung einer Pflanze enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 oder eine mit dieser hybridisierende DNA-Sequenz zur Herstellung pflanzlicher und bakterieller DOXS.

Abbildung 1

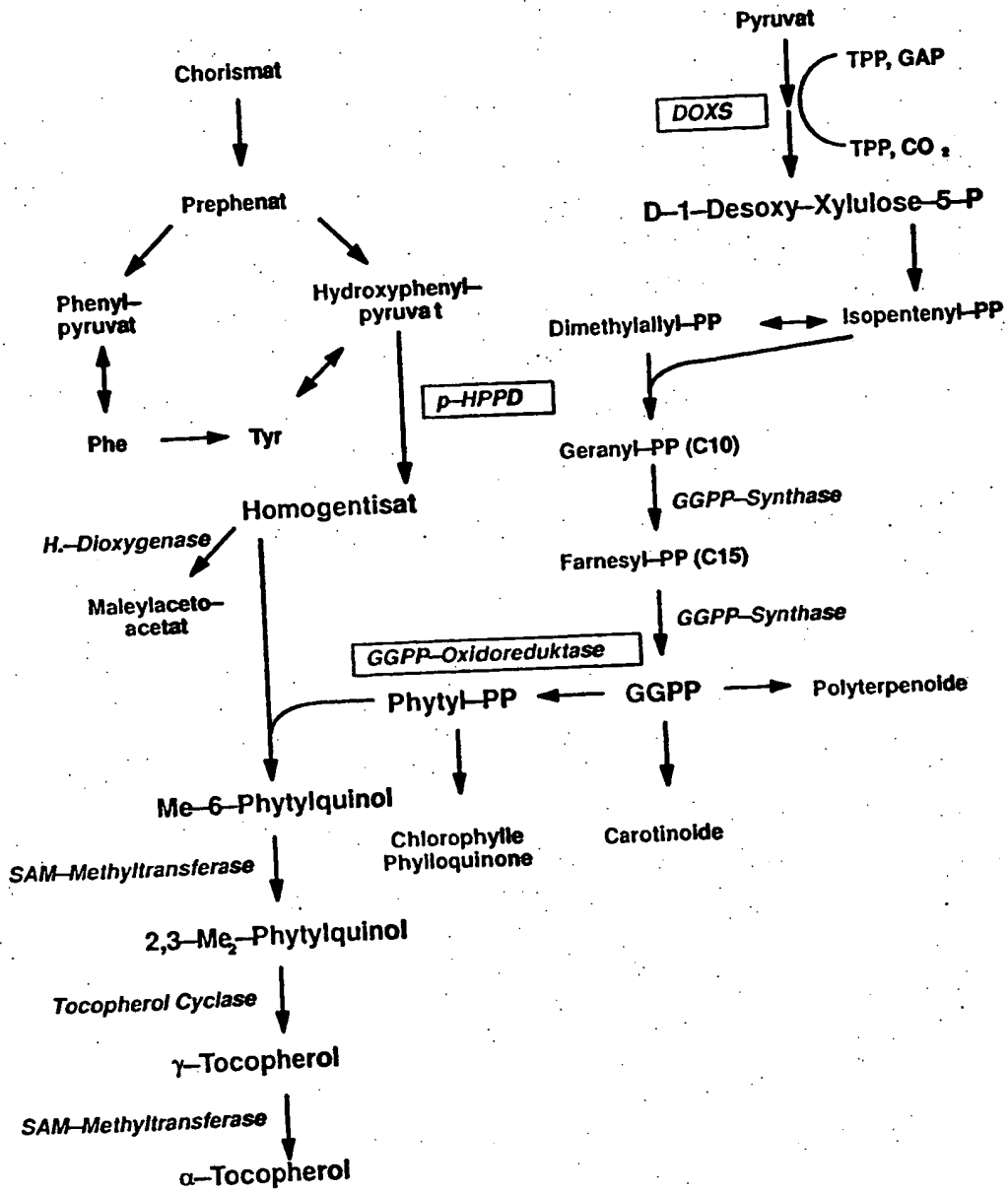
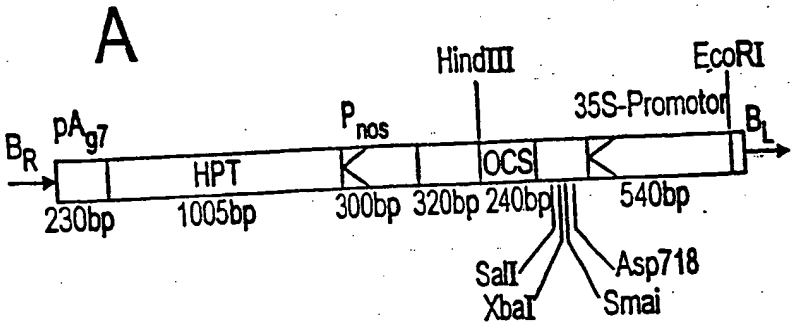
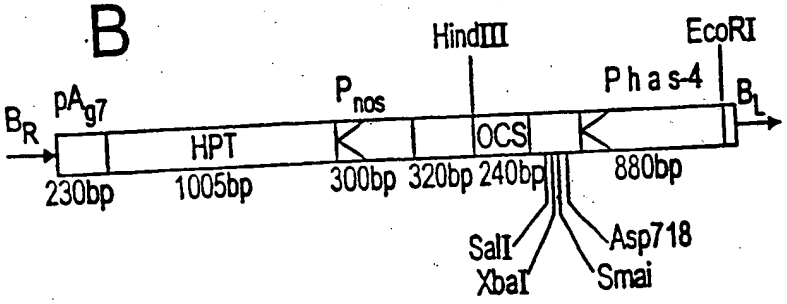

Pyruvat
TPP, GAP
DOXS
TPP, CO 2
D-1-Desoxy-Xylulose-5-P
Chorismat
Prephenat
Phenyl-pyruvat
Hydroxyphenyl-pyruvat
Dimethylallyl-PP
Isopentenyl-PP
p-HPPD
Phe
Tyr
Geranyl-PP (C10)
Homogentisat
GGPP-Synthase
H.-Dioxygenase
Farnesyl-PP (C15)
Maleylaceto-acetat
GGPP-Synthase
GGPP-Oxidoreduktase
Phytyl-PP
GGPP
Polyterpenoide
Me-6-Phytylquinol
Chlorophylle
Phylloquinone
Carotinoide
SAM-Methyltransferase
2,3-Me2-Phytylquinol
Tocopherol Cyclase
γ-Tocopherol
SAM-Methyltransferase
α-Tocopherol

Abbildung 2


A
HindIII
EcoRI
35S-Promotor
B_R
pA_{g7}
P_{nos}
B_L
HPT
OCS
230bp
1005bp
300bp
320bp
240bp
540bp
SalI
XbaI
Asp718
SmaI


B
HindIII
EcoRI
Phas-4
B_R
pA_{g7}
P_{nos}
B_L
HPT
OCS
230bp
1005bp
300bp
320bp
240bp
880bp
SalI
XbaI
Asp718
SmaI

pBin19-3X 35S-F-23-C (Sense)

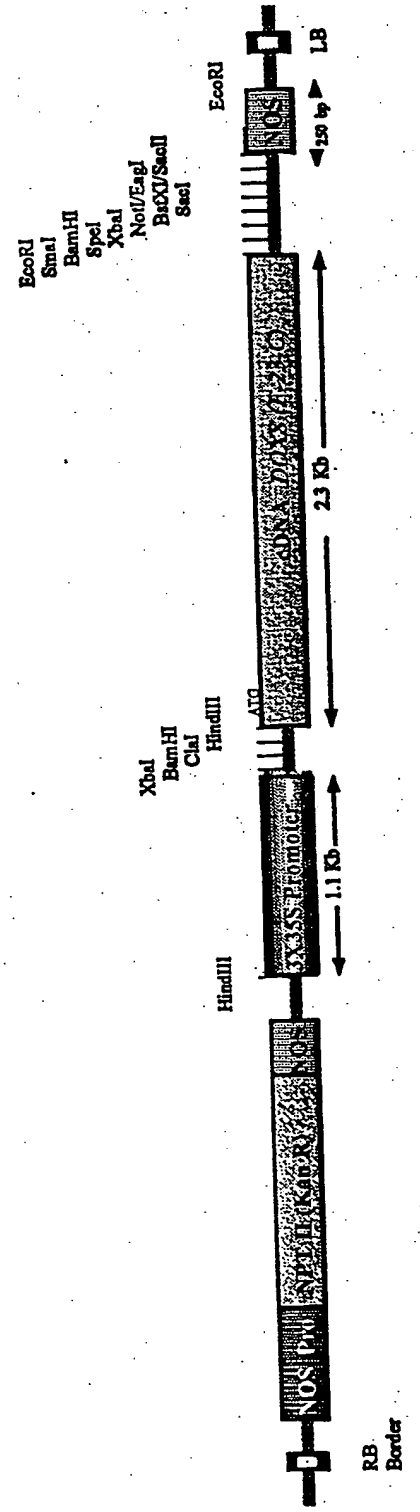


Abbildung 3

BNSDOCID: <WO___0008169A1_I_>

pBin19-3X 35S-DOXS (Antisense)

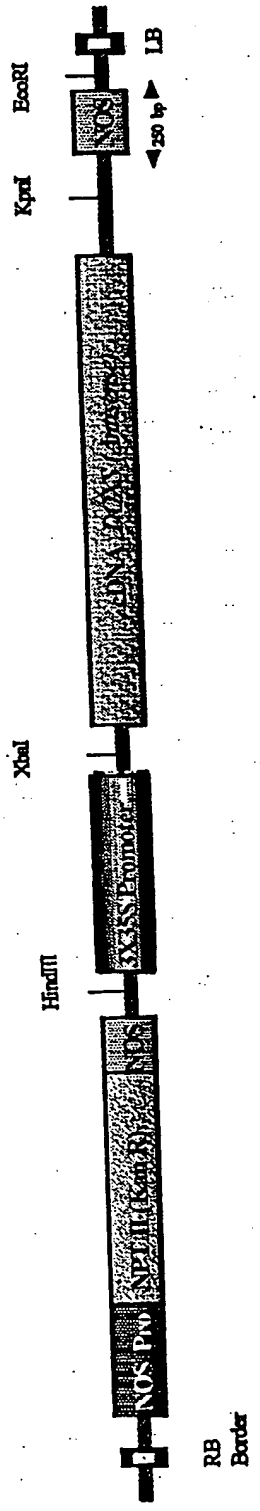


Abbildung 4

BNSDOCID: <WO___0008169A1_I_>

Abbildung 5

Binärer Vektor zur Überexpression des DOXS-Gens aus E.coli im Zytosol transgener Pflanzen

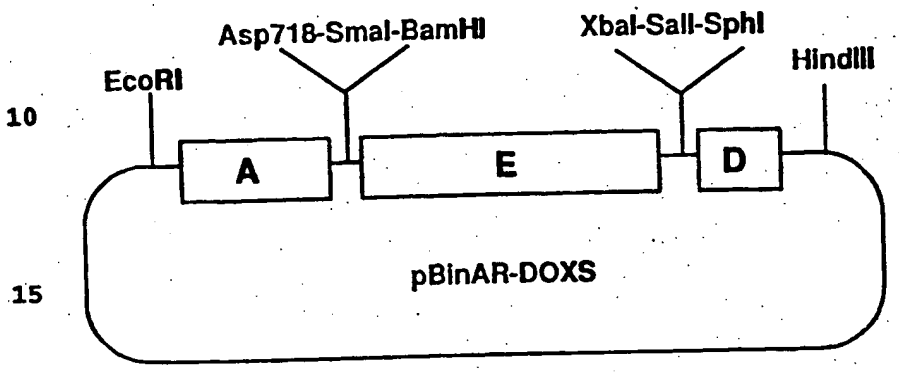


Abbildung 6

Binärer Vektor zur Überexpression des DOXS-Gens aus E. coli in Plastiden transgener Pflanzen.

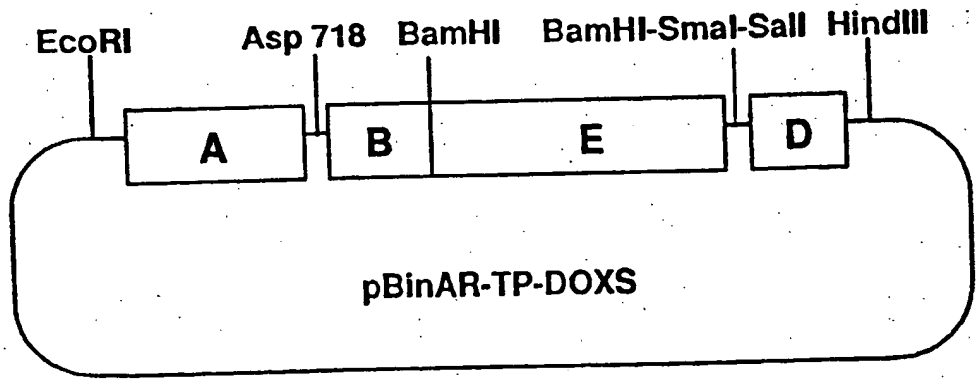


Abbildung 7: RNA Expressionslevel des DOXS-Gens

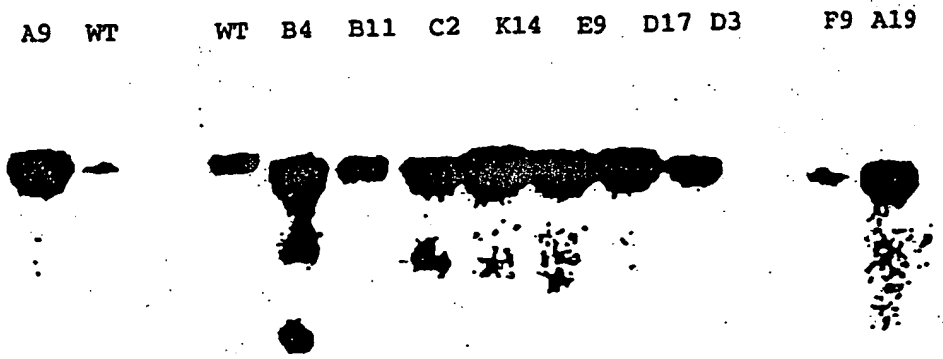


Abbildung 8: Protein-Mengen in transgenen Pflanzen

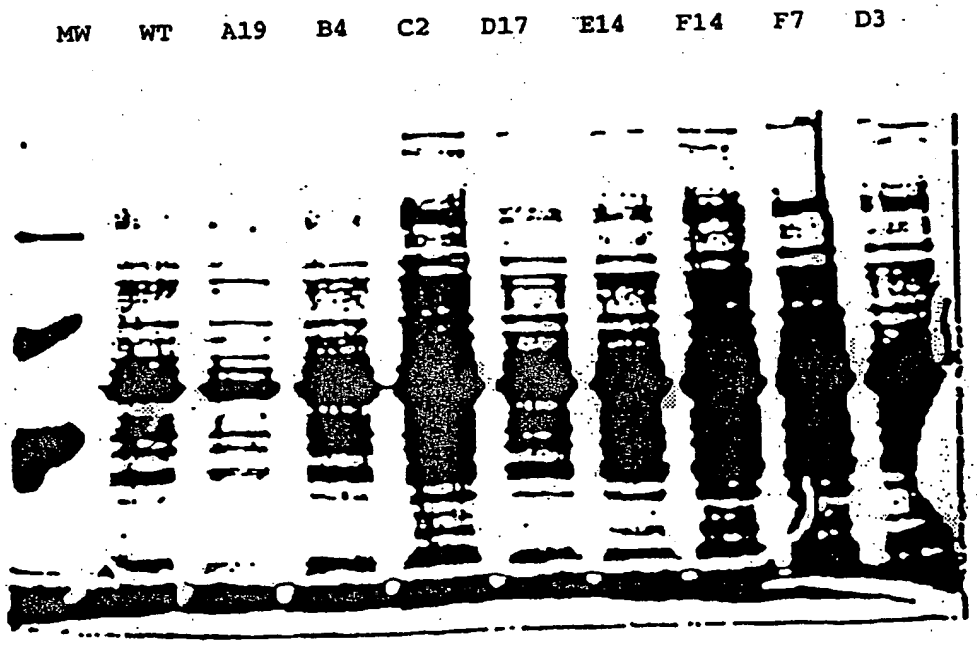
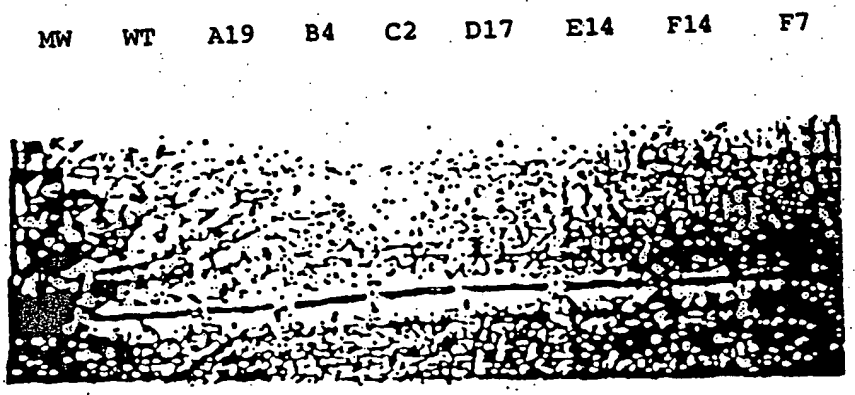


Abbildung 9: Westernanalyse



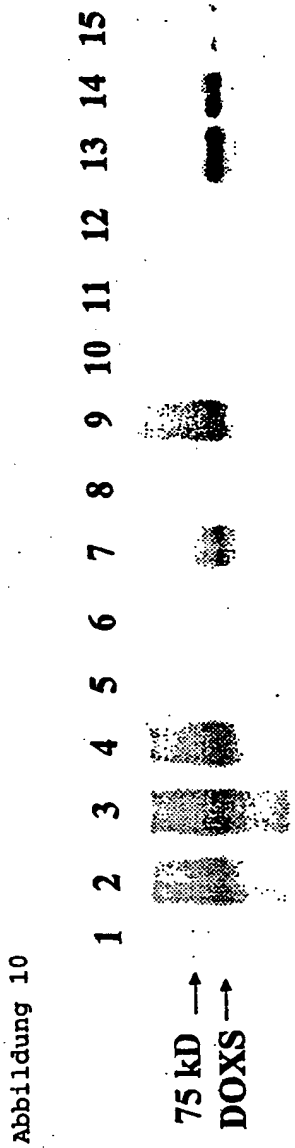


Abbildung 10

BNSDOCID: <WO___0008169A1_I_>

Abbildung 11

Binärer Vektor zur Überexpression des HPPD-Gens aus Streptomyces avermitilis im Zytosol transgener Pflazen

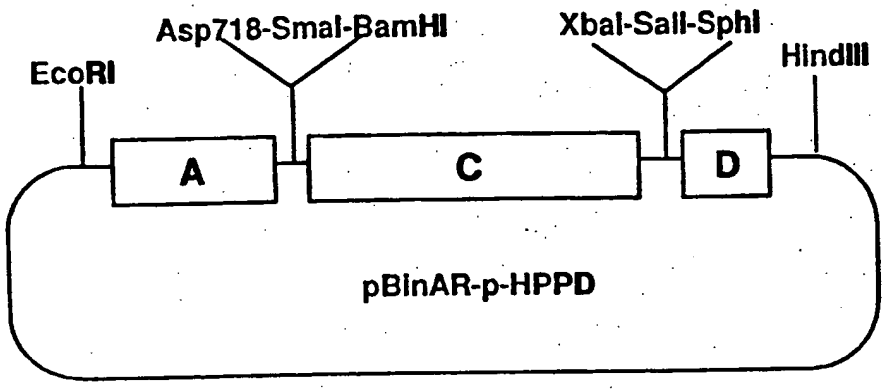


Abbildung 12

Binärer Vektor zur Überexpression des HPPD-Gens aus Steptomyces avermitilis im Plastiden transgener Pflanzen

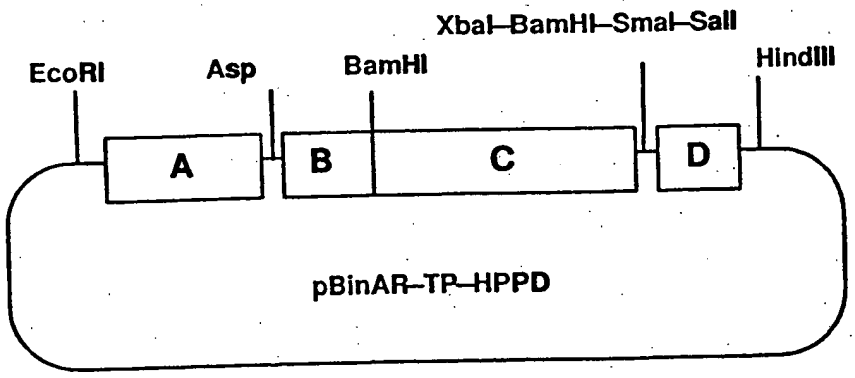


Abbildung 13

Binärer Vektor zur Überexpression des HPPD-gens aus Streptomyces avermitilis und des DOXS-Gens aus E.coli in Plastiden transgener Pflanzen.

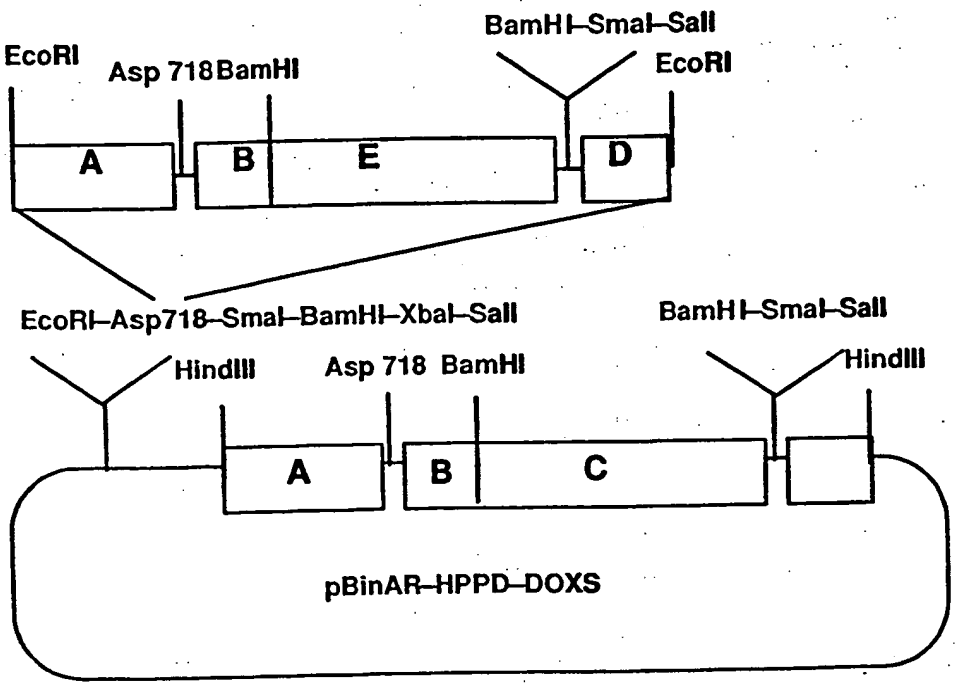


Abbildung 14

Binärer Vektor zur Überexpression des GGPPOR-Gens aus Arabidopsis thaliana in Plastiden transgener Pflanzen.

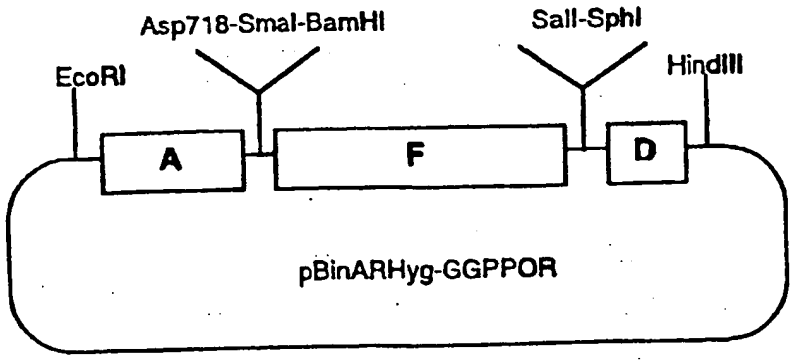


Abbildung 15

Binärer Vektor zur Überexpression des GGPPOR-Gens aus Arabidopsis thaliana und des DOXS-Gens aus E. coli in Plastiden transgener Pflanzen.

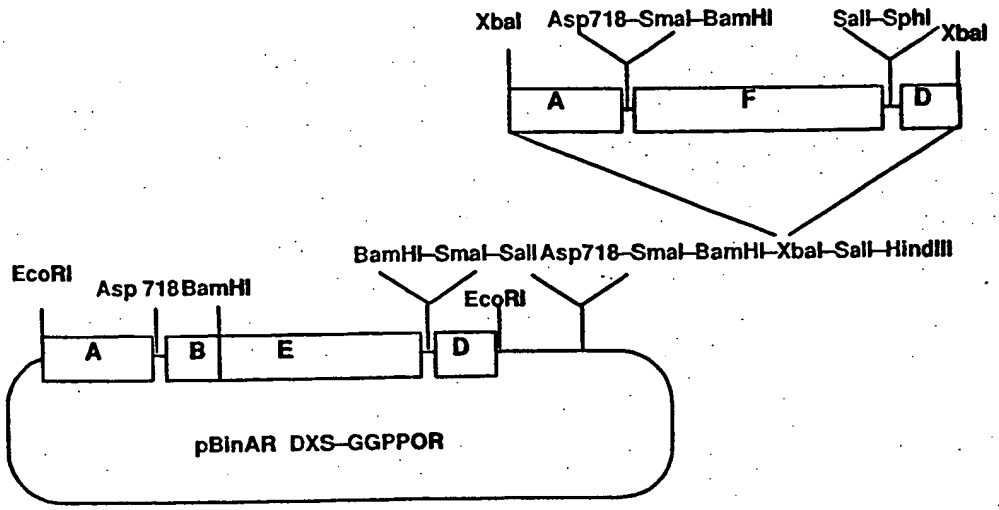
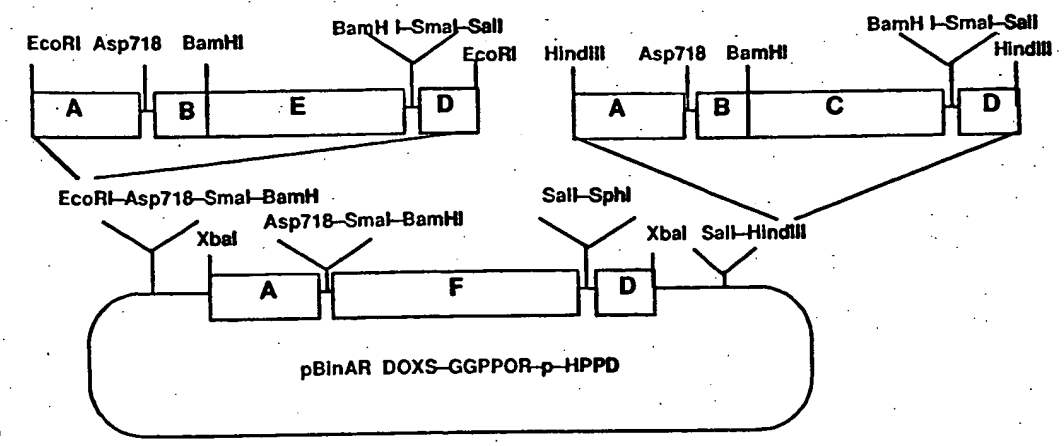


Abbildung 16

Binärer Vektor zur Überexpression des DOXS-Gens aus *E. coli*, des GGPPOR-Gens aus *Arabidopsis thaliana* und des HPPD-Gens aus *Streptomyces avermitilis* in den Plastiden transgener Pflanzen.



1

SEQUENZPROTOKOLL

<110> SunGene GmbH & Co.KGaA

<120> DNA-Sequenz kodierend fuer eine
1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase

<130> 0050/49249

<140> 0817 - 00006
<141> 1999-08-04

<160> 8

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1
<211> 2458
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2154)

<400> 1

```
atg gct tct tct gca ttt gct ttt cct tct tac ata ata acc aaa gga   48
Met Ala Ser Ser Ala Phe Ala Phe Pro Ser Tyr Ile Ile Thr Lys Gly
  1               5                  10                  15

gga ctt tca act gat tct tgt aaa tca act tct ttg tct tct tct aga   96
Gly Leu Ser Thr Asp Ser Cys Lys Ser Thr Ser Leu Ser Ser Ser Arg
            20                  25                  30

tct ttg gtt aca gat ctt cca tca cca tgt ctg aaa ccc aac aac aat   144
Ser Leu Val Thr Asp Leu Pro Ser Pro Cys Leu Lys Pro Asn Asn Asn
         35                  40                  45

tcc cat tca aac aga aga gca aaa gtg tgt gct tca ctt gca gag aag   192
Ser His Ser Asn Arg Arg Ala Lys Val Cys Ala Ser Leu Ala Glu Lys
     50                  55                  60

ggt gaa tat tat tca aac aga cca cca act cca tta ctt gac act att   240
Gly Glu Tyr Tyr Ser Asn Arg Pro Pro Thr Pro Leu Leu Asp Thr Ile
 65                  70                  75                  80

aac tac cca atc cac atg aaa aat ctt tct gtc aag gaa ctg aaa caa   288
Asn Tyr Pro Ile His Met Lys Asn Leu Ser Val Lys Glu Leu Lys Gln
```


BNSDOCID: <WO___0008169A1_I_>

```
                85                  90                  95

ctt tct gat gag ctg aga tca gac gtg atc ttt aat gtg tcg aaa acc   336
Leu Ser Asp Glu Leu Arg Ser Asp Val Ile Phe Asn Val Ser Lys Thr
            100                 105                 110

ggt gga cat ttg ggg tca agt ctt ggt gtt gtg gag ctt act gtg gct   384
Gly Gly His Leu Gly Ser Ser Leu Gly Val Val Glu Leu Thr Val Ala
        115                 120                 125

ctt cat tac att ttc aat act cca caa gac aag att ctt tgg gat gtt   432
Leu His Tyr Ile Phe Asn Thr Pro Gln Asp Lys Ile Leu Trp Asp Val
    130                 135                 140

ggt cat cag tct tat cct cat aag att ctt act ggg aga aga gga aag   480
Gly His Gln Ser Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Gly Lys
145                 150                 155                 160

atg cct aca atg agg caa acc aat ggt ctc tct ggt ttc acc aaa cga   528
Met Pro Thr Met Arg Gln Thr Asn Gly Leu Ser Gly Phe Thr Lys Arg
                165                 170                 175

gga gag agt gaa cat gat tgc ttt ggt act gga cac agc tca acc aca   576
Gly Glu Ser Glu His Asp Cys Phe Gly Thr Gly His Ser Ser Thr Thr
            180                 185                 190

ata tct gct ggt tta gga atg gcg gta gga agg gat ttg aag ggg aag   624
Ile Ser Ala Gly Leu Gly Met Ala Val Gly Arg Asp Leu Lys Gly Lys
        195                 200                 205

aac aac aat gtg gtt gct gtg att ggt gat ggt gcg atg acg gca gga   672
Asn Asn Asn Val Val Ala Val Ile Gly Asp Gly Ala Met Thr Ala Gly
    210                 215                 220

cag gct tat gaa gcc atg aac aac gcc gga tat cta gac tct gat atg   720
Gln Ala Tyr Glu Ala Met Asn Asn Ala Gly Tyr Leu Asp Ser Asp Met
225                 230                 235                 240

att gtg att ctt aat gac aac aag caa gtc tca tta cct aca gct act   768
Ile Val Ile Leu Asn Asp Asn Lys Gln Val Ser Leu Pro Thr Ala Thr
                245                 250                 255

ttg gat gga cca agt cca cct gtt ggt gca ttg agc agt gct ctt agt   816
Leu Asp Gly Pro Ser Pro Pro Val Gly Ala Leu Ser Ser Ala Leu Ser
            260                 265                 270

cgg tta cag tct aac ccg gct ctc aga gag ttg aga gaa gtc gca aag   864
Arg Leu Gln Ser Asn Pro Ala Leu Arg Glu Leu Arg Glu Val Ala Lys
```


BNSDOCID: <WO___0008169A1_I_>

275 280 285

ggt atg aca aag caa ata ggc gga cca atg cat cag ttg gcg gct aag 912
Gly Met Thr Lys Gln Ile Gly Gly Pro Met His Gln Leu Ala Ala Lys
290 295 300

gta gat gtg tat gct cga gga atg ata agc ggt act gga tcg tca ctg 960
Val Asp Val Tyr Ala Arg Gly Met Ile Ser Gly Thr Gly Ser Ser Leu
305 310 315 320

ttt gaa gaa ctc ggt ctt tac tat att ggt cca gtt gat ggg cac aac 1008
Phe Glu Glu Leu Gly Leu Tyr Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly His Asn
325 330 335

ata gat gat ttg gta gcc att ctt aaa gaa gtt aag agt acc aga acc 1056
Ile Asp Asp Leu Val Ala Ile Leu Lys Glu Val Lys Ser Thr Arg Thr
340 345 350

aca gga cct gta ctt att cat gtg gtg acg gag aaa ggt cgt ggt tat 1104
Thr Gly Pro Val Leu Ile His Val Val Thr Glu Lys Gly Arg Gly Tyr
355 360 365

cct tac gcg gag aga gct gat gac aaa tac cat ggt gtt gtg aaa ttt 1152
Pro Tyr Ala Glu Arg Ala Asp Asp Lys Tyr His Gly Val Val Lys Phe
370 375 380

gat cca gca acg ggt aga cag ttc aaa act act aat gag act caa tct 1200
Asp Pro Ala Thr Gly Arg Gln Phe Lys Thr Thr Asn Glu Thr Gln Ser
385 390 395 400

tac aca act tac ttt gcg gag gca tta gtc gca gaa gca gag gta gac 1248
Tyr Thr Thr Tyr Phe Ala Glu Ala Leu Val Ala Glu Ala Glu Val Asp
405 410 415

aaa gat gtg gtt gcg att cat gca gcc atg gga ggt gga acc ggg tta 1296
Lys Asp Val Val Ala Ile His Ala Ala Met Gly Gly Gly Thr Gly Leu
420 425 430

aat ctc ttt caa cgt cgc ttc cca aca aga tgt ttc gat gta gga ata 1344
Asn Leu Phe Gln Arg Arg Phe Pro Thr Arg Cys Phe Asp Val Gly Ile
435 440 445

gcg gaa caa cac gca gtt act ttt gct gcg ggt tta gcc tgt gaa ggc 1392
Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Cys Glu Gly
450 455 460

ctt aaa ccc ttc tgt gca atc tat tcg tct ttc atg cag cgt gct tat 1440
Leu Lys Pro Phe Cys Ala Ile Tyr Ser Ser Phe Met Gln Arg Ala Tyr

BNSDOCID: <WO___0008169A1_I_>

```
465                 470                 475                 480

gac cag gtt gtc cat gat gtt gat ttg caa aaa tta ccg gtg aga ttt   1488
Asp Gln Val Val His Asp Val Asp Leu Gln Lys Leu Pro Val Arg Phe
                485                 490                 495

gca atg gat aga gct gga ctc gtt gga gct gat ggt ccg aca cat tgt   1536
Ala Met Asp Arg Ala Gly Leu Val Gly Ala Asp Gly Pro Thr His Cys
            500                 505                 510

gga gct ttc gat gtg aca ttt atg gct tgt ctt cct aac atg ata gtg   1584
Gly Ala Phe Asp Val Thr Phe Met Ala Cys Leu Pro Asn Met Ile Val
        515                 520                 525

atg gct cca tca gat gaa gca gat ctc ttt aac atg gtt gca act gct   1632
Met Ala Pro Ser Asp Glu Ala Asp Leu Phe Asn Met Val Ala Thr Ala
    530                 535                 540

gtt gcg att gat gat cgt cct tct tgt ttc cgt tac cct aga ggt aac   1680
Val Ala Ile Asp Asp Arg Pro Ser Cys Phe Arg Tyr Pro Arg Gly Asn
545                 550                 555                 560

ggt att gga gtt gca tta cct ccc gga aac aaa ggt gtt cca att gag   1728
Gly Ile Gly Val Ala Leu Pro Pro Gly Asn Lys Gly Val Pro Ile Glu
                565                 570                 575

att ggg aaa ggt aga att tta aag gaa gga gag aga gtt gcg ttg ttg   1776
Ile Gly Lys Gly Arg Ile Leu Lys Glu Gly Glu Arg Val Ala Leu Leu
            580                 585                 590

ggt tat ggc tca gca gtt cag agc tgt tta gga gcg gct gta atg ctc   1824
Gly Tyr Gly Ser Ala Val Gln Ser Cys Leu Gly Ala Ala Val Met Leu
        595                 600                 605

gaa gaa cgc gga tta aac gta act gta gcg gat gca cgg ttt tgc aag   1872
Glu Glu Arg Gly Leu Asn Val Thr Val Ala Asp Ala Arg Phe Cys Lys
    610                 615                 620

cca ttg gac cgt gct ctc att cgc agc tta gct aag tcg cac gag gtt   1920
Pro Leu Asp Arg Ala Leu Ile Arg Ser Leu Ala Lys Ser His Glu Val
625                 630                 635                 640

ctg atc acg gtt gaa gaa ggt tcc att gga ggt ttt ggc tcg cac gtt   1968
Leu Ile Thr Val Glu Glu Gly Ser Ile Gly Gly Phe Gly Ser His Val
                645                 650                 655

gtt cag ttt ctt gct ctc gat ggt ctt ctt gat ggc aaa ctc aag tgg   2016
Val Gln Phe Leu Ala Leu Asp Gly Leu Leu Asp Gly Lys Leu Lys Trp
```


BNSDOCID: <WO___0008169A1_I_>

660 665 670

aga cca atg gta ctg cct gat cga tac att gat cac ggt gca cca gct 2064
Arg Pro Met Val Leu Pro Asp Arg Tyr Ile Asp His Gly Ala Pro Ala
675 680 685

gat caa cta gct gaa gct gga ctc atg cca tct cac atc gca gca acc 2112
Asp Gln Leu Ala Glu Ala Gly Leu Met Pro Ser His Ile Ala Ala Thr
690 695 700

gca ctt aac tta atc ggt gca cca agg gaa gct ctg ttt tga 2154
Ala Leu Asn Leu Ile Gly Ala Pro Arg Glu Ala Leu Phe
705 710 715

gagtaagaat ctgttggcta aaacatatgt atacaaacac tctaaatgca acccaaggtt 2214

tcttctaagt actgatcaga attcccgccc gagaagtcct ttggcaacag ctatatatat 2274

ttactaagat tgtgaagaga aaggcaaagg caaaggttgt gcaaagatta gtattataga 2334

taaaactggt atttgttttg taattttagg attgtgatga gatcgtgttg taccaataac 2394

taacatcttg taaaatcaat tactctcttg tgatcttcaa taagcttgag tgacaaaaaa 2454

aaaa 2458

<210> 2
<211> 717
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2
Met Ala Ser Ser Ala Phe Ala Phe Pro Ser Tyr Ile Ile Thr Lys Gly
1 5 10 15

Gly Leu Ser Thr Asp Ser Cys Lys Ser Thr Ser Leu Ser Ser Ser Arg
20 25 30

Ser Leu Val Thr Asp Leu Pro Ser Pro Cys Leu Lys Pro Asn Asn Asn
35 40 45

Ser His Ser Asn Arg Arg Ala Lys Val Cys Ala Ser Leu Ala Glu Lys
50 55 60

Gly Glu Tyr Tyr Ser Asn Arg Pro Pro Thr Pro Leu Leu Asp Thr Ile
65 70 75 80

BNSDOCID: <WO___0008169A1_I_>

```
Asn Tyr Pro Ile His Met Lys Asn Leu Ser Val Lys Glu Leu Lys Gln
                85                  90                  95

Leu Ser Asp Glu Leu Arg Ser Asp Val Ile Phe Asn Val Ser Lys Thr
            100                 105                 110

Gly Gly His Leu Gly Ser Ser Leu Gly Val Val Glu Leu Thr Val Ala
        115                 120                 125

Leu His Tyr Ile Phe Asn Thr Pro Gln Asp Lys Ile Leu Trp Asp Val
    130                 135                 140

Gly His Gln Ser Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Gly Lys
145                 150                 155                 160

Met Pro Thr Met Arg Gln Thr Asn Gly Leu Ser Gly Phe Thr Lys Arg
                165                 170                 175

Gly Glu Ser Glu His Asp Cys Phe Gly Thr Gly His Ser Ser Thr Thr
            180                 185                 190

Ile Ser Ala Gly Leu Gly Met Ala Val Gly Arg Asp Leu Lys Gly Lys
        195                 200                 205

Asn Asn Asn Val Val Ala Val Ile Gly Asp Gly Ala Met Thr Ala Gly
    210                 215                 220

Gln Ala Tyr Glu Ala Met Asn Asn Ala Gly Tyr Leu Asp Ser Asp Met
225                 230                 235                 240

Ile Val Ile Leu Asn Asp Asn Lys Gln Val Ser Leu Pro Thr Ala Thr
                245                 250                 255

Leu Asp Gly Pro Ser Pro Pro Val Gly Ala Leu Ser Ser Ala Leu Ser
            260                 265                 270

Arg Leu Gln Ser Asn Pro Ala Leu Arg Glu Leu Arg Glu Val Ala Lys
        275                 280                 285

Gly Met Thr Lys Gln Ile Gly Gly Pro Met His Gln Leu Ala Ala Lys
    290                 295                 300

Val Asp Val Tyr Ala Arg Gly Met Ile Ser Gly Thr Gly Ser Ser Leu
305                 310                 315                 320

Phe Glu Glu Leu Gly Leu Tyr Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly His Asn
                325                 330                 335
```


BNSDOCID: <WO____0008169A1_I_>

```
Ile Asp Asp Leu Val Ala Ile Leu Lys Glu Val Lys Ser Thr Arg Thr
            340                 345                 350

Thr Gly Pro Val Leu Ile His Val Val Thr Glu Lys Gly Arg Gly Tyr
        355                 360                 365

Pro Tyr Ala Glu Arg Ala Asp Asp Lys Tyr His Gly Val Val Lys Phe
    370                 375                 380

Asp Pro Ala Thr Gly Arg Gln Phe Lys Thr Thr Asn Glu Thr Gln Ser
385                 390                 395                 400

Tyr Thr Thr Tyr Phe Ala Glu Ala Leu Val Ala Glu Ala Glu Val Asp
                405                 410                 415

Lys Asp Val Val Ala Ile His Ala Ala Met Gly Gly Gly Thr Gly Leu
            420                 425                 430

Asn Leu Phe Gln Arg Arg Phe Pro Thr Arg Cys Phe Asp Val Gly Ile
        435                 440                 445

Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Cys Glu Gly
    450                 455                 460

Leu Lys Pro Phe Cys Ala Ile Tyr Ser Ser Phe Met Gln Arg Ala Tyr
465                 470                 475                 480

Asp Gln Val Val His Asp Val Asp Leu Gln Lys Leu Pro Val Arg Phe
                485                 490                 495

Ala Met Asp Arg Ala Gly Leu Val Gly Ala Asp Gly Pro Thr His Cys
            500                 505                 510

Gly Ala Phe Asp Val Thr Phe Met Ala Cys Leu Pro Asn Met Ile Val
        515                 520                 525

Met Ala Pro Ser Asp Glu Ala Asp Leu Phe Asn Met Val Ala Thr Ala
    530                 535                 540

Val Ala Ile Asp Asp Arg Pro Ser Cys Phe Arg Tyr Pro Arg Gly Asn
545                 550                 555                 560

Gly Ile Gly Val Ala Leu Pro Pro Gly Asn Lys Gly Val Pro Ile Glu
                565                 570                 575

Ile Gly Lys Gly Arg Ile Leu Lys Glu Gly Glu Arg Val Ala Leu Leu
            580                 585                 590
```


BNSDOCID: <WO___0008169A1_I_>

Gly Tyr Gly Ser Ala Val Gln Ser Cys Leu Gly Ala Ala Val Met Leu
595 600 605

Glu Glu Arg Gly Leu Asn Val Thr Val Ala Asp Ala Arg Phe Cys Lys
610 615 620

Pro Leu Asp Arg Ala Leu Ile Arg Ser Leu Ala Lys Ser His Glu Val
625 630 635 640

Leu Ile Thr Val Glu Glu Gly Ser Ile Gly Gly Phe Gly Ser His Val
645 650 655

Val Gln Phe Leu Ala Leu Asp Gly Leu Leu Asp Gly Lys Leu Lys Trp
660 665 670

Arg Pro Met Val Leu Pro Asp Arg Tyr Ile Asp His Gly Ala Pro Ala
675 680 685

Asp Gln Leu Ala Glu Ala Gly Leu Met Pro Ser His Ile Ala Ala Thr
690 695 700

Ala Leu Asn Leu Ile Gly Ala Pro Arg Glu Ala Leu Phe
705 710 715

<210> 3
<211> 1863
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1863)

<400> 3
atg agt ttt gat att gcc aaa tac ccg acc ctg gca ctg gtc gac tcc 48
Met Ser Phe Asp Ile Ala Lys Tyr Pro Thr Leu Ala Leu Val Asp Ser
1 5 10 15

acc cag gag tta cga ctg ttg ccg aaa gag agt tta ccg aaa ctc tgc 96
Thr Gln Glu Leu Arg Leu Leu Pro Lys Glu Ser Leu Pro Lys Leu Cys
20 25 30

gac gaa ctg cgc cgc tat tta ctc gac agc gtg agc cgt tcc agc ggg 144
Asp Glu Leu Arg Arg Tyr Leu Leu Asp Ser Val Ser Arg Ser Ser Gly
35 40 45

cac ttc gcc tcc ggg ctg ggc acg gtc gaa ctg acc gtg gcg ctg cac 192

BNSDOCID: <WO___0008169A1_I_>

```
His Phe Ala Ser Gly Leu Gly Thr Val Glu Leu Thr Val Ala Leu His
     50                  55                  60

tat gtc tac aac acc ccg ttt gac caa ttg att tgg gat gtg ggg cat   240
Tyr Val Tyr Asn Thr Pro Phe Asp Gln Leu Ile Trp Asp Val Gly His
 65                  70                  75                  80

cag gct tat ccg cat aaa att ttg acc gga cgc cgc gac aaa atc ggc   288
Gln Ala Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Lys Ile Gly
                 85                  90                  95

acc atc cgt cag aaa ggc ggt ctg cac ccg ttc ccg tgg cgc ggc gaa   336
Thr Ile Arg Gln Lys Gly Gly Leu His Pro Phe Pro Trp Arg Gly Glu
            100                 105                 110

agc gaa tat gac gta tta agc gtc ggg cat tca tca acc tcc atc agt   384
Ser Glu Tyr Asp Val Leu Ser Val Gly His Ser Ser Thr Ser Ile Ser
        115                 120                 125

gcc gga att ggt att gcg gtt gct gcc gaa aaa gaa ggc aaa aat cgc   432
Ala Gly Ile Gly Ile Ala Val Ala Ala Glu Lys Glu Gly Lys Asn Arg
    130                 135                 140

cgc acc gtc tgt gtc att ggc gat ggc gcg att acc gca ggc atg gcg   480
Arg Thr Val Cys Val Ile Gly Asp Gly Ala Ile Thr Ala Gly Met Ala
145                 150                 155                 160

ttt gaa gcg atg aat cac gcg ggc gat atc cgt cct gat atg ctg gtg   528
Phe Glu Ala Met Asn His Ala Gly Asp Ile Arg Pro Asp Met Leu Val
                165                 170                 175

att ctc aac gac aat gaa atg tcg att tcc gaa aat gtc ggc gcg ctc   576
Ile Leu Asn Asp Asn Glu Met Ser Ile Ser Glu Asn Val Gly Ala Leu
            180                 185                 190

aac aac cat ctg gca cag ctg ctt tcc ggt aag ctt tac tct tca ctg   624
Asn Asn His Leu Ala Gln Leu Leu Ser Gly Lys Leu Tyr Ser Ser Leu
        195                 200                 205

cgc gaa ggc ggg aaa aaa gtt ttc tct ggc gtg ccg cca att aaa gag   672
Arg Glu Gly Gly Lys Lys Val Phe Ser Gly Val Pro Pro Ile Lys Glu
    210                 215                 220

ctg ctc aaa cgc acc gaa gaa cat att aaa ggc atg gta gtg cct ggc   720
Leu Leu Lys Arg Thr Glu Glu His Ile Lys Gly Met Val Val Pro Gly
225                 230                 235                 240

acg ttg ttt gaa gag ctg ggc ttt aac tac atc ggc ccg gtg gac ggt   768
```


BNSDOCID: <WO___0008169A1_I_>

```
Thr Leu Phe Glu Glu Leu Gly Phe Asn Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly
                245                 250                 255

cac gat gtg ctg ggg ctt atc acc acg cta aag aac atg cgc gac ctg   816
His Asp Val Leu Gly Leu Ile Thr Thr Leu Lys Asn Met Arg Asp Leu
            260                 265                 270

aaa ggc ccg cag ttc ctg cat atc atg acc aaa aaa ggt cgt ggt tat   864
Lys Gly Pro Gln Phe Leu His Ile Met Thr Lys Lys Gly Arg Gly Tyr
        275                 280                 285

gaa ccg gca gaa aaa gac ccg atc act ttc cac gcc gtg cct aaa ttt   912
Glu Pro Ala Glu Lys Asp Pro Ile Thr Phe His Ala Val Pro Lys Phe
    290                 295                 300

gat ccc tcc agc ggt tgt ttg ccg aaa agt agc ggc ggt ttg ccg agc   960
Asp Pro Ser Ser Gly Cys Leu Pro Lys Ser Ser Gly Gly Leu Pro Ser
305                 310                 315                 320

tat tca aaa atc ttt ggc gac tgg ttg tgc gaa acg gca gcg aaa gac  1008
Tyr Ser Lys Ile Phe Gly Asp Trp Leu Cys Glu Thr Ala Ala Lys Asp
                325                 330                 335

aac aag ctg atg gcg att act ccg gcg atg cgt gaa ggt tcc ggc atg  1056
Asn Lys Leu Met Ala Ile Thr Pro Ala Met Arg Glu Gly Ser Gly Met
            340                 345                 350

gtc gag ttt tca cgt aaa ttc ccg gat cgc tac ttc gac gtg gca att  1104
Val Glu Phe Ser Arg Lys Phe Pro Asp Arg Tyr Phe Asp Val Ala Ile
        355                 360                 365

gcc gag caa cac gcg gtg acc ttt gct gcg ggt ctg gcg att ggt ggg  1152
Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Ile Gly Gly
    370                 375                 380

tac aaa ccc att gtc gcg att tac tcc act ttc ctg caa cgc gcc tat  1200
Tyr Lys Pro Ile Val Ala Ile Tyr Ser Thr Phe Leu Gln Arg Ala Tyr
385                 390                 395                 400

gat cag gtg ctg cat gac gtg gcg att caa aag ctt ccg gtc ctg ttc  1248
Asp Gln Val Leu His Asp Val Ala Ile Gln Lys Leu Pro Val Leu Phe
                405                 410                 415

gcc atc gac cgc gcg ggc att gtt ggt gct gac ggt caa acc cat cag  1296
Ala Ile Asp Arg Ala Gly Ile Val Gly Ala Asp Gly Gln Thr His Gln
            420                 425                 430

ggt gct ttt gat ctc tct tac ctg cgc tgc ata ccg gaa atg gtc att  1344
```


BNSDOCID: <WO___0008169A1_I_>

```
Gly Ala Phe Asp Leu Ser Tyr Leu Arg Cys Ile Pro Glu Met Val Ile
        435                 440                 445

atg acc ccg agc gat gaa aac gaa tgt cgc cag atg ctc tat acc ggc  1392
Met Thr Pro Ser Asp Glu Asn Glu Cys Arg Gln Met Leu Tyr Thr Gly
    450                 455                 460

tat cac tat aac gat ggc ccg tca gcg gtg cgc tac ccg cgt ggc aac  1440
Tyr His Tyr Asn Asp Gly Pro Ser Ala Val Arg Tyr Pro Arg Gly Asn
465                 470                 475                 480

gcg gtc ggc gtg gaa ctg acg ccg ctg gaa aaa cta cca att ggc aaa  1488
Ala Val Gly Val Glu Leu Thr Pro Leu Glu Lys Leu Pro Ile Gly Lys
                485                 490                 495

ggc att gtg aag cgt cgt ggc gag aaa ctg gcg atc ctt aac ttt ggt  1536
Gly Ile Val Lys Arg Arg Gly Glu Lys Leu Ala Ile Leu Asn Phe Gly
            500                 505                 510

acg ctg atg cca gaa gcg gcg aaa gtc gcc gaa tcg ctg aac gcc acg  1584
Thr Leu Met Pro Glu Ala Ala Lys Val Ala Glu Ser Leu Asn Ala Thr
        515                 520                 525

ctg gtc gat atg cgt ttt gtg aaa ccg ctt gat gaa gcg tta att ctg  1632
Leu Val Asp Met Arg Phe Val Lys Pro Leu Asp Glu Ala Leu Ile Leu
    530                 535                 540

gaa atg gcc gcc agc cat gaa gcg ctg gtc acc gta gaa gaa aac gcc  1680
Glu Met Ala Ala Ser His Glu Ala Leu Val Thr Val Glu Glu Asn Ala
545                 550                 555                 560

att atg ggc ggc gca ggc agc ggc gtg aac gaa gtg ctg atg gcc cat  1728
Ile Met Gly Gly Ala Gly Ser Gly Val Asn Glu Val Leu Met Ala His
                565                 570                 575

cgt aaa cca gta ccc gtg ctg aac att ggc ctg ccg gac ttc ttt att  1776
Arg Lys Pro Val Pro Val Leu Asn Ile Gly Leu Pro Asp Phe Phe Ile
            580                 585                 590

ccg caa gga act cag gaa gaa atg cgc gcc gaa ctc ggc ctc gat gcc  1824
Pro Gln Gly Thr Gln Glu Glu Met Arg Ala Glu Leu Gly Leu Asp Ala
        595                 600                 605

gct ggt atg gaa gcc aaa atc aag gcc tgg ctg gca taa              1863
Ala Gly Met Glu Ala Lys Ile Lys Ala Trp Leu Ala
    610                 615                 620
```


BNSDOCID: <WO___0008169A1_I_>

<210> 4
<211> 620
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 4

```
Met Ser Phe Asp Ile Ala Lys Tyr Pro Thr Leu Ala Leu Val Asp Ser
 1               5                  10                  15

Thr Gln Glu Leu Arg Leu Leu Pro Lys Glu Ser Leu Pro Lys Leu Cys
            20                  25                  30

Asp Glu Leu Arg Arg Tyr Leu Leu Asp Ser Val Ser Arg Ser Ser Gly
        35                  40                  45

His Phe Ala Ser Gly Leu Gly Thr Val Glu Leu Thr Val Ala Leu His
    50                  55                  60

Tyr Val Tyr Asn Thr Pro Phe Asp Gln Leu Ile Trp Asp Val Gly His
65                  70                  75                  80

Gln Ala Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Lys Ile Gly
                85                  90                  95

Thr Ile Arg Gln Lys Gly Gly Leu His Pro Phe Pro Trp Arg Gly Glu
            100                 105                 110

Ser Glu Tyr Asp Val Leu Ser Val Gly His Ser Ser Thr Ser Ile Ser
        115                 120                 125

Ala Gly Ile Gly Ile Ala Val Ala Ala Glu Lys Glu Gly Lys Asn Arg
    130                 135                 140

Arg Thr Val Cys Val Ile Gly Asp Gly Ala Ile Thr Ala Gly Met Ala
145                 150                 155                 160

Phe Glu Ala Met Asn His Ala Gly Asp Ile Arg Pro Asp Met Leu Val
                165                 170                 175

Ile Leu Asn Asp Asn Glu Met Ser Ile Ser Glu Asn Val Gly Ala Leu
            180                 185                 190

Asn Asn His Leu Ala Gln Leu Leu Ser Gly Lys Leu Tyr Ser Ser Leu
        195                 200                 205

Arg Glu Gly Gly Lys Lys Val Phe Ser Gly Val Pro Pro Ile Lys Glu
    210                 215                 220
```


BNSDOCID: <WO___0008169A1_I_>

```
Leu Leu Lys Arg Thr Glu Glu His Ile Lys Gly Met Val Val Pro Gly
225                 230                 235                 240

Thr Leu Phe Glu Glu Leu Gly Phe Asn Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly
                245                 250                 255

His Asp Val Leu Gly Leu Ile Thr Thr Leu Lys Asn Met Arg Asp Leu
            260                 265                 270

Lys Gly Pro Gln Phe Leu His Ile Met Thr Lys Lys Gly Arg Gly Tyr
        275                 280                 285

Glu Pro Ala Glu Lys Asp Pro Ile Thr Phe His Ala Val Pro Lys Phe
    290                 295                 300

Asp Pro Ser Ser Gly Cys Leu Pro Lys Ser Ser Gly Gly Leu Pro Ser
305                 310                 315                 320

Tyr Ser Lys Ile Phe Gly Asp Trp Leu Cys Glu Thr Ala Ala Lys Asp
                325                 330                 335

Asn Lys Leu Met Ala Ile Thr Pro Ala Met Arg Glu Gly Ser Gly Met
            340                 345                 350

Val Glu Phe Ser Arg Lys Phe Pro Asp Arg Tyr Phe Asp Val Ala Ile
        355                 360                 365

Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Ile Gly Gly
    370                 375                 380

Tyr Lys Pro Ile Val Ala Ile Tyr Ser Thr Phe Leu Gln Arg Ala Tyr
385                 390                 395                 400

Asp Gln Val Leu His Asp Val Ala Ile Gln Lys Leu Pro Val Leu Phe
                405                 410                 415

Ala Ile Asp Arg Ala Gly Ile Val Gly Ala Asp Gly Gln Thr His Gln
            420                 425                 430

Gly Ala Phe Asp Leu Ser Tyr Leu Arg Cys Ile Pro Glu Met Val Ile
        435                 440                 445

Met Thr Pro Ser Asp Glu Asn Glu Cys Arg Gln Met Leu Tyr Thr Gly
    450                 455                 460

Tyr His Tyr Asn Asp Gly Pro Ser Ala Val Arg Tyr Pro Arg Gly Asn
465                 470                 475                 480
```


BNSDOCID: <WO__0008169A1_I_>

```
Ala Val Gly Val Glu Leu Thr Pro Leu Glu Lys Leu Pro Ile Gly Lys
                485                 490                 495

Gly Ile Val Lys Arg Arg Gly Glu Lys Leu Ala Ile Leu Asn Phe Gly
            500                 505                 510

Thr Leu Met Pro Glu Ala Ala Lys Val Ala Glu Ser Leu Asn Ala Thr
        515                 520                 525

Leu Val Asp Met Arg Phe Val Lys Pro Leu Asp Glu Ala Leu Ile Leu
    530                 535                 540

Glu Met Ala Ala Ser His Glu Ala Leu Val Thr Val Glu Glu Asn Ala
545                 550                 555                 560

Ile Met Gly Gly Ala Gly Ser Gly Val Asn Glu Val Leu Met Ala His
                565                 570                 575

Arg Lys Pro Val Pro Val Leu Asn Ile Gly Leu Pro Asp Phe Phe Ile
            580                 585                 590

Pro Gln Gly Thr Gln Glu Glu Met Arg Ala Glu Leu Gly Leu Asp Ala
        595                 600                 605

Ala Gly Met Glu Ala Lys Ile Lys Ala Trp Leu Ala
    610                 615                 620
```

<210> 5
<211> 1469
<212> DNA
<213> Streptomyces avermitilis

<220>
<221> CDS
<222> (218)..(1138)

<400> 5
gatatccgag cgccgccggg tccactgcgg tccgaagccg cggatgactc cattcgactg 60

aagccggtcg agccgcgcct gcacggtgcc gcgcgcgacc ccgagccgcc gggacatctc 120

gagcactccg atgcgcggct cccgcgccag cagcaccagg agccggccgt ccagatgatc 180

gatcgccacg gcagcccctc cagtggtcat cctgtac atg cag ccc cac gcc atg 235
 Met Gln Pro His Ala Met
 1 5

BNSDOCID: <WO___0008169A1_I_>

```
ggc ggt gca ctg aac aca ttg tcc agc gga caa gcc aac tat tgc gca   283
Gly Gly Ala Leu Asn Thr Leu Ser Ser Gly Gln Ala Asn Tyr Cys Ala
            10                  15                  20

cct tgc gga acg gag cga ccc tgc cgc cat gac gca gac cac aca cca   331
Pro Cys Gly Thr Glu Arg Pro Cys Arg His Asp Ala Asp His Thr Pro
        25                  30                  35

cac tcc cga cac cgc ccg gca ggc cga ccc ctt ccc ggt gaa ggg aat   379
His Ser Arg His Arg Pro Ala Gly Arg Pro Leu Pro Gly Glu Gly Asn
    40                  45                  50

gga cgc ggt cgt ctt cgc cgt agg caa cgc caa gca ggc cgc gca cta   427
Gly Arg Gly Arg Leu Arg Arg Arg Gln Arg Gln Ala Gly Arg Ala Leu
55                  60                  65                  70

ctc cac cgc ctt cgg cat gca gct tgt ggc gta ctc cgg acc gga gaa   475
Leu His Arg Leu Arg His Ala Ala Cys Gly Val Leu Arg Thr Gly Glu
                75                  80                  85

cgg cag ccg cga gac cgc ttc gta cgt cct cac caa cgg ctc ggc acg   523
Arg Gln Pro Arg Asp Arg Phe Val Arg Pro His Gln Arg Leu Gly Thr
            90                  95                  100

ctt cgt cct cac ctc cgt cat caa gcc cgc cac ccc ctg ggg cca ctt   571
Leu Arg Pro His Leu Arg His Gln Ala Arg His Pro Leu Gly Pro Leu
        105                 110                 115

cct cgc cga cca tgt ggc cga gca cgg cga cgg cgt cgt cga cct cgc   619
Pro Arg Arg Pro Cys Gly Arg Ala Arg Arg Arg Arg Arg Arg Pro Arg
    120                 125                 130

cat cga ggt ccc gga cgc ccg cgc cgc cca cgc gta cgc gat cga gca   667
His Arg Gly Pro Gly Arg Pro Arg Arg Pro Arg Val Arg Asp Arg Ala
135                 140                 145                 150

cgg cgc ccg ctc ggt cgc cga gcc gta cga gct gaa gga cga gca cgg   715
Arg Arg Pro Leu Gly Arg Arg Ala Val Arg Ala Glu Gly Arg Ala Arg
                155                 160                 165

cac ggt cgt cct cgc cgc gat cgc cac cta cgg caa gac ccg cca cac   763
His Gly Arg Pro Arg Arg Asp Arg His Leu Arg Gln Asp Pro Pro His
            170                 175                 180

cct cgt cga ccg gac cgg cta cga cgg ccc cta cct ccc cgg cta cgt   811
Pro Arg Arg Pro Asp Arg Leu Arg Arg Pro Leu Pro Pro Arg Leu Arg
        185                 190                 195
```


BNSDOCID: <WO___0008169A1_I_>

```
ggc cgc cgc ccc gat cgt cga acc gcc cgc cca ccg cac ctt cca ggc   859
Gly Arg Arg Pro Asp Arg Arg Thr Ala Arg Pro Pro His Leu Pro Gly
    200                 205                 210

cat cga cca ctg cgt cgg caa cgt cga gct cgg ccg gat gaa cga atg   907
His Arg Pro Leu Arg Arg Gln Arg Arg Ala Arg Pro Asp Glu Arg Met
215                 220                 225                 230

ggt cgg ctt cta caa caa ggt cat ggg ctt cac gaa cat gaa gga gtt   955
Gly Arg Leu Leu Gln Gln Gly His Gly Leu His Glu His Glu Gly Val
                235                 240                 245

cgt ggg cga cga cat cgc gac cga gta ctc ggc gct gat gtc gaa ggt   1003
Arg Gly Arg Arg His Arg Asp Arg Val Leu Gly Ala Asp Val Glu Gly
            250                 255                 260

cgt ggc cga cgg cac gct caa ggt caa gtt ccc gat caa cga gcc cgc   1051
Arg Gly Arg Arg His Ala Gln Gly Gln Val Pro Asp Gln Arg Ala Arg
        265                 270                 275

cct cgc caa gaa gaa gtc cca gat cga cga gta cct gga gtt cta cgg   1099
Pro Arg Gln Glu Glu Val Pro Asp Arg Arg Val Pro Gly Val Leu Arg
    280                 285                 290

cgg cgc ggg cgt cca gca cat cgc gct gaa cac ggg tga catcgtcgag    1148
Arg Arg Gly Arg Pro Ala His Arg Ala Glu His Gly
295                 300                 305

acggtacgca cgatgcgcgc cgccggcgtc cagttcctgg acacgcccga ctcgtactac 1208

gacaccctcg gggagtgggt gggcgacacc cgcgtccccg tcgacaccct gcgcgagctg 1268

aagatcctcg cggaccgcga cgaggacggc tatctgctcc agatcttcac caagccggtc 1328

caggaccgcc cgacggtctt cttcgagatc atcgaacgcc acggctcgat gggattcggc 1388

aagggcaact tcaaggccct gttcgaggcg atcgagcggg agcaggagaa gcggggcaac 1448

ctgtaggcgg cgcggcccgg g                                          1469
```

<210> 6
<211> 306
<212> PRT
<213> Streptomyces avermitilis

<400> 6
Met Gln Pro His Ala Met Gly Gly Ala Leu Asn Thr Leu Ser Ser Gly

BNSDOCID: <WO___0008169A1_I_>

1 5 10 15

Gln Ala Asn Tyr Cys Ala Pro Cys Gly Thr Glu Arg Pro Cys Arg His
20 25 30

Asp Ala Asp His Thr Pro His Ser Arg His Arg Pro Ala Gly Arg Pro
35 40 45

Leu Pro Gly Glu Gly Asn Gly Arg Gly Arg Leu Arg Arg Arg Gln Arg
50 55 60

Gln Ala Gly Arg Ala Leu Leu His Arg Leu Arg His Ala Ala Cys Gly
65 70 75 80

Val Leu Arg Thr Gly Glu Arg Gln Pro Arg Asp Arg Phe Val Arg Pro
85 90 95

His Gln Arg Leu Gly Thr Leu Arg Pro His Leu Arg His Gln Ala Arg
100 105 110

His Pro Leu Gly Pro Leu Pro Arg Arg Pro Cys Gly Arg Ala Arg Arg
115 120 125

Arg Arg Arg Arg Pro Arg His Arg Gly Pro Gly Arg Pro Arg Arg Pro
130 135 140

Arg Val Arg Asp Arg Ala Arg Arg Pro Leu Gly Arg Arg Ala Val Arg
145 150 155 160

Ala Glu Gly Arg Ala Arg His Gly Arg Pro Arg Arg Asp Arg His Leu
165 170 175

Arg Gln Asp Pro Pro His Pro Arg Arg Pro Asp Arg Leu Arg Arg Pro
180 185 190

Leu Pro Pro Arg Leu Arg Gly Arg Arg Pro Asp Arg Arg Thr Ala Arg
195 200 205

Pro Pro His Leu Pro Gly His Arg Pro Leu Arg Arg Gln Arg Arg Ala
210 215 220

Arg Pro Asp Glu Arg Met Gly Arg Leu Leu Gln Gln Gly His Gly Leu
225 230 235 240

His Glu His Glu Gly Val Arg Gly Arg Arg His Arg Asp Arg Val Leu
245 250 255

Gly Ala Asp Val Glu Gly Arg Gly Arg Arg His Ala Gln Gly Gln Val

BNSDOCID: <WO___0008169A1_I_>

260 265 270

Pro Asp Gln Arg Ala Arg Pro Arg Gln Glu Glu Val Pro Asp Arg Arg
275 280 285

Val Pro Gly Val Leu Arg Arg Arg Gly Arg Pro Ala His Arg Ala Glu
290 295 300

His Gly
305

<210> 7
<211> 1479
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1401)

<400> 7
atg gcg acg acg gtt aca ctc aaa tcc ttc acc gga ctt cgt caa tca 48
Met Ala Thr Thr Val Thr Leu Lys Ser Phe Thr Gly Leu Arg Gln Ser
1 5 10 15

tca acg gag caa aca aac ttc gtc tct cat gta ccg tca tca ctt tct 96
Ser Thr Glu Gln Thr Asn Phe Val Ser His Val Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

ctc cct caa cga cgg acc tct ctc cga gta acc gca gcc agg gcc act 144
Leu Pro Gln Arg Arg Thr Ser Leu Arg Val Thr Ala Ala Arg Ala Thr
35 40 45

ccc aaa ctc tcc aac cgt aaa ctc cgt gtc gcc gtc atc ggt ggt gga 192
Pro Lys Leu Ser Asn Arg Lys Leu Arg Val Ala Val Ile Gly Gly Gly
50 55 60

cca gca ggc ggg gca gct gca gag act cta gca caa gga gga atc gag 240
Pro Ala Gly Gly Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ala Gln Gly Gly Ile Glu
65 70 75 80

acg att ctc atc gag cgt aag atg gac aat tgc aag cct tgc ggt ggc 288
Thr Ile Leu Ile Glu Arg Lys Met Asp Asn Cys Lys Pro Cys Gly Gly
85 90 95

gcg att cct ctc tgt atg gtc gga gaa ttc aac ttg ccg ttg gat att 336
Ala Ile Pro Leu Cys Met Val Gly Glu Phe Asn Leu Pro Leu Asp Ile

BNSDOCID: <WO__0008169A1_I >

```
          100                 105                 110

att gat cgg aga gtg acg aag atg aag atg att tcg ccg tcg aac att   384
Ile Asp Arg Arg Val Thr Lys Met Lys Met Ile Ser Pro Ser Asn Ile
        115                 120                 125

gct gtt gat att ggt cgt acg ctt aag gag cat gag tat ata ggt atg   432
Ala Val Asp Ile Gly Arg Thr Leu Lys Glu His Glu Tyr Ile Gly Met
    130                 135                 140

gtg aga aga gaa gtt ctt gat gct tat ctg aga gag aga gct gag aag   480
Val Arg Arg Glu Val Leu Asp Ala Tyr Leu Arg Glu Arg Ala Glu Lys
145                 150                 155                 160

agt gga gcc act gtg att aac ggt ctc ttc ctt aag atg gat cat ccg   528
Ser Gly Ala Thr Val Ile Asn Gly Leu Phe Leu Lys Met Asp His Pro
                165                 170                 175

gag aat tgg gac tcg ccg tac act ttg cat tac act gag tac gat ggt   576
Glu Asn Trp Asp Ser Pro Tyr Thr Leu His Tyr Thr Glu Tyr Asp Gly
            180                 185                 190

aaa act gga gct aca ggg acg aag aaa aca atg gag gtt gat gct gtc   624
Lys Thr Gly Ala Thr Gly Thr Lys Lys Thr Met Glu Val Asp Ala Val
        195                 200                 205

att gga gct gat gga gct aac tct agg gtt gct aaa tct att gat gct   672
Ile Gly Ala Asp Gly Ala Asn Ser Arg Val Ala Lys Ser Ile Asp Ala
    210                 215                 220

ggt gat tac gac tac gca att gca ttt cag gag agg att agg att cct   720
Gly Asp Tyr Asp Tyr Ala Ile Ala Phe Gln Glu Arg Ile Arg Ile Pro
225                 230                 235                 240

gat gag aaa atg act tac tat gag gat tta gct gag atg tat gtt gga   768
Asp Glu Lys Met Thr Tyr Tyr Glu Asp Leu Ala Glu Met Tyr Val Gly
                245                 250                 255

gat gat gtg tcg ccg gat ttc tat ggt tgg gtg ttc cct aag tgc gac   816
Asp Asp Val Ser Pro Asp Phe Tyr Gly Trp Val Phe Pro Lys Cys Asp
            260                 265                 270

cat gta gct gtt gga aca ggt act gtg act cac aaa ggt gac atc aag   864
His Val Ala Val Gly Thr Gly Thr Val Thr His Lys Gly Asp Ile Lys
        275                 280                 285

aag ttc cag ctc gcg acc aga aac aga gct aag gac aag att ctt gga   912
Lys Phe Gln Leu Ala Thr Arg Asn Arg Ala Lys Asp Lys Ile Leu Gly
```


BNSDOCID: <WO___0008169A1_I_>

```
   290                 295                 300

ggg aag atc atc cgt gtg gag gct cat ccg att cct gaa cat ccg aga   960
Gly Lys Ile Ile Arg Val Glu Ala His Pro Ile Pro Glu His Pro Arg
305                 310                 315                 320

cca cgt agg ctc tcg aaa cgt gtg gct ctt gta ggt gat gct gca ggg   1008
Pro Arg Arg Leu Ser Lys Arg Val Ala Leu Val Gly Asp Ala Ala Gly
                325                 330                 335

tat gtg act aaa tgc tct ggt gaa ggg atc tac ttt gct gct aag agt   1056
Tyr Val Thr Lys Cys Ser Gly Glu Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Lys Ser
            340                 345                 350

gga aga atg tgt gct gaa gcc att gtc gaa ggt tca cag aat ggt aag   1104
Gly Arg Met Cys Ala Glu Ala Ile Val Glu Gly Ser Gln Asn Gly Lys
        355                 360                 365

aag atg att gac gaa ggg gac ttg agg aag tac ttg gag aaa tgg gat   1152
Lys Met Ile Asp Glu Gly Asp Leu Arg Lys Tyr Leu Glu Lys Trp Asp
    370                 375                 380

aag aca tac ttg cct acc tac agg gta ctt gat gtg ttg cag aaa gtg   1200
Lys Thr Tyr Leu Pro Thr Tyr Arg Val Leu Asp Val Leu Gln Lys Val
385                 390                 395                 400

ttt tac aga tca aat ccg gct aga gaa gcg ttt gtg gag atg tgt aat   1248
Phe Tyr Arg Ser Asn Pro Ala Arg Glu Ala Phe Val Glu Met Cys Asn
                405                 410                 415

gat gag tat gtt cag aag atg aca ttc gat agc tat ctg tac aag cgg   1296
Asp Glu Tyr Val Gln Lys Met Thr Phe Asp Ser Tyr Leu Tyr Lys Arg
            420                 425                 430

gtt gcg ccg ggt agt cct ttg gag gat atc aag ttg gct gtg aac acc   1344
Val Ala Pro Gly Ser Pro Leu Glu Asp Ile Lys Leu Ala Val Asn Thr
        435                 440                 445

att gga agt ttg gtt agg gct aat gct cta agg aga gag att gag aag   1392
Ile Gly Ser Leu Val Arg Ala Asn Ala Leu Arg Arg Glu Ile Glu Lys
    450                 455                 460

ctt agt gtt taagaaacaa ataatgaggt ctatctcctt tcttcatctc           1441
Leu Ser Val
465

tatctctctt tttttgtctg ttagtaatct atctacac                         1479
```


BNSDOCID: <WO___0008169A1_I_>

<210> 8
<211> 467
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 8

```
Met Ala Thr Thr Val Thr Leu Lys Ser Phe Thr Gly Leu Arg Gln Ser
 1               5                  10                  15

Ser Thr Glu Gln Thr Asn Phe Val Ser His Val Pro Ser Ser Leu Ser
            20                  25                  30

Leu Pro Gln Arg Arg Thr Ser Leu Arg Val Thr Ala Ala Arg Ala Thr
        35                  40                  45

Pro Lys Leu Ser Asn Arg Lys Leu Arg Val Ala Val Ile Gly Gly Gly
    50                  55                  60

Pro Ala Gly Gly Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ala Gln Gly Gly Ile Glu
65                  70                  75                  80

Thr Ile Leu Ile Glu Arg Lys Met Asp Asn Cys Lys Pro Cys Gly Gly
                85                  90                  95

Ala Ile Pro Leu Cys Met Val Gly Glu Phe Asn Leu Pro Leu Asp Ile
            100                 105                 110

Ile Asp Arg Arg Val Thr Lys Met Lys Met Ile Ser Pro Ser Asn Ile
        115                 120                 125

Ala Val Asp Ile Gly Arg Thr Leu Lys Glu His Glu Tyr Ile Gly Met
    130                 135                 140

Val Arg Arg Glu Val Leu Asp Ala Tyr Leu Arg Glu Arg Ala Glu Lys
145                 150                 155                 160

Ser Gly Ala Thr Val Ile Asn Gly Leu Phe Leu Lys Met Asp His Pro
                165                 170                 175

Glu Asn Trp Asp Ser Pro Tyr Thr Leu His Tyr Thr Glu Tyr Asp Gly
            180                 185                 190

Lys Thr Gly Ala Thr Gly Thr Lys Lys Thr Met Glu Val Asp Ala Val
        195                 200                 205

Ile Gly Ala Asp Gly Ala Asn Ser Arg Val Ala Lys Ser Ile Asp Ala
    210                 215                 220
```


BNSDOCID: <WO___0008169A1_I_>

```
Gly Asp Tyr Asp Tyr Ala Ile Ala Phe Gln Glu Arg Ile Arg Ile Pro
225                 230                 235                 240

Asp Glu Lys Met Thr Tyr Tyr Glu Asp Leu Ala Glu Met Tyr Val Gly
                245                 250                 255

Asp Asp Val Ser Pro Asp Phe Tyr Gly Trp Val Phe Pro Lys Cys Asp
            260                 265                 270

His Val Ala Val Gly Thr Gly Thr Val Thr His Lys Gly Asp Ile Lys
        275                 280                 285

Lys Phe Gln Leu Ala Thr Arg Asn Arg Ala Lys Asp Lys Ile Leu Gly
    290                 295                 300

Gly Lys Ile Ile Arg Val Glu Ala His Pro Ile Pro Glu His Pro Arg
305                 310                 315                 320

Pro Arg Arg Leu Ser Lys Arg Val Ala Leu Val Gly Asp Ala Ala Gly
                325                 330                 335

Tyr Val Thr Lys Cys Ser Gly Glu Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Lys Ser
            340                 345                 350

Gly Arg Met Cys Ala Glu Ala Ile Val Glu Gly Ser Gln Asn Gly Lys
        355                 360                 365

Lys Met Ile Asp Glu Gly Asp Leu Arg Lys Tyr Leu Glu Lys Trp Asp
    370                 375                 380

Lys Thr Tyr Leu Pro Thr Tyr Arg Val Leu Asp Val Leu Gln Lys Val
385                 390                 395                 400

Phe Tyr Arg Ser Asn Pro Ala Arg Glu Ala Phe Val Glu Met Cys Asn
                405                 410                 415

Asp Glu Tyr Val Gln Lys Met Thr Phe Asp Ser Tyr Leu Tyr Lys Arg
            420                 425                 430

Val Ala Pro Gly Ser Pro Leu Glu Asp Ile Lys Leu Ala Val Asn Thr
        435                 440                 445

Ile Gly Ser Leu Val Arg Ala Asn Ala Leu Arg Arg Glu Ile Glu Lys
    450                 455                 460

Leu Ser Val
465
```


BNSDOCID: <WO___0008169A1_I_>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/05467

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/53 C12N15/54 C12N15/82 C12N9/10 C12N9/04
C12Q1/02 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LANGE B M ET AL: "A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, (1998 MAR 3) 95 (5) 2100-4. , XP002116672 cited in the application	1,2,9, 13,17,18
Y	see particularly the las paragraph	20,21
X	MANDEL A. ET AL.: "CLA1, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution" PLANT JOURNAL, vol. 9, no. 5, 1996, pages 649-658, XP002122907 the whole document	22

-/—

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 November 1999	03/12/1999

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Kania, T

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

BNSDOCID: <WO___0008169A1_I_>

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 723 017 A (BASF AG) 24 July 1996 (1996-07-24) page 3, line 35-54	20,21
A	WO 97 27285 A (UNIV ARIZONA) 31 July 1997 (1997-07-31) cited in the application the whole document	1-22
A	WO 98 06862 A (SHEWMAKER CHRISTINE K ;CALGENE INC (US)) 19 February 1998 (1998-02-19) the whole document	1-22
A	LOIS L M ET AL: "Cloning and characterization of a gene from Escherichia coli encoding a transketolase-like enzyme that catalyzes the synthesis of D-1-deoxyxylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin and pyridoxol biosynthesis." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, (1998 MAR 3) 95 (5) 2105-10. , XP002116673 the whole document	1-22
A	SPRENGER G A ET AL: "Identification of a thiamin-dependent synthase in Escherichia coli required for the formation of the 1-deoxy-D- xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, (1997 NOV 25) 94 (24) 12857-62. , XP002116674 cited in the application the whole document	1-22
A	KELLER ET AL: "metabolic compartmentation of plastid prenyllipid biosynthesis - evidence for the involvement of a multifunctional geranylgeranyl reductase" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY,DE,BERLIN, vol. 251, no. 1/02, page 413-417-417 XP002100518 ISSN: 0014-2956 cited in the application the whole document	1-22
P,X	WO 99 11757 A (MCCASKILL DAVID G ;LANGE BERND M (US); UNIV WASHINGTON (US); WILDU) 11 March 1999 (1999-03-11) see particularly Page 14 line 29 to Page 15 line 21.	1,2,9, 13,17-22

-/—

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/05467

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	DE 197 52 700 A (HOECHST SCHERING AGREVO GMBH) 2 June 1999 (1999-06-02) see particularly Page 6 line 20 and following; Example 6	20,21
E	WO 99 52938 A (HASSAN JOMAA) 21 October 1999 (1999-10-21) the whole document	18-22

1

BNSDOCID: <WO___0008169A1_I_>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 99/05467

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0723017 A	24-07-1996	DE 19501906 A	25-07-1996
		CA 2167768 A	24-07-1996
		US 5912169 A	15-06-1999
		US 5925535 A	20-07-1999
WO 9727285 A	31-07-1997	AU 1845397 A	20-08-1997
		EP 0877793 A	18-11-1998
		JP 11510708 T	21-09-1999
WO 9806862 A	19-02-1998	AU 4058497 A	06-03-1998
		CN 1227609 A	01-09-1999
		EP 0925366 A	30-06-1999
WO 9911757 A	11-03-1999	AU 8925898 A	22-03-1999
DE 19752700 A	02-06-1999	DE 29800547 U	08-04-1999
		JP 11169186 A	29-06-1999
WO 9952938 A	21-10-1999	DE 19825585 A	21-10-1999
		WO 9952515 A	21-10-1999

ANSDOCID: <WO 0008169A1 I >